

Untersuchungen an der Maus über die Toxizität,
Teratogenität und Mutagenität der Herbizide
N-(4-Chlorphenyl)-N'-methyl-N'-methoxyharnstoff
(Monolinuron) und
N-(4-Chlorphenyl)-N'-methyl-N'-isobutinylharnstoff
(Buturon)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs 23
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gunther Matthiaschk
aus Berlin

Berlin 1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen an der Maus über die Toxizität,
Teratogenität und Mutagenität der Herbizide
N-(4-Chlorphenyl)-N'-methyl-N'-methoxyharnstoff
(Monolinuron) und
N-(4-Chlorphenyl)-N'-methyl-N'-isobutinylharnstoff
(Buturon)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs 23
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gunther Matthiaschk
aus Berlin

Berlin 1975

Referent : Professor Dr. H.J. Belitz
Koreferent : Professor Dr. Sperling



Tag der letzten Prüfung: 22. Dezember 1975

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen

Herrn Prof. Dr. Dr. med. F. Bär, Leiter der Abteilung Toxikologie des Max von Pettenkofer - Instituts im Bundesgesundheitsamt, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung die experimentellen Untersuchungen durchführen zu können.

Herrn Dr. R. Roll, Laborleiter in der Abteilung Toxikologie, für die Anregung zu der Arbeit und die stets hilfsbereite Anteilnahme an ihrem Fortgang.

Meinem verehrten akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. H.J. Belitz, Institut für Genetik an der Freien Universität Berlin, für die Betreuung, Durchsicht und Beurteilung der Arbeit.

Frau B. Fissler für die hervorragende technische Assistenz.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Einleitung	1
Material und Methode	23
1. Versuchstiere und Substanzen	23
2. Untersuchungen der akuten Toxizität	25
3. Untersuchungen zur Teratogenität	25
4. Aufzuchtversuche	26
5. Untersuchungen zur Mutagenität	27
a. Test auf dominante Letalfaktoren	27
b. Chromosomendarstellung aus Knochenmarkzellen	29
Ergebnisse	32
1. Untersuchungen der akuten Toxizität (LD ₅₀)	32
A. Monolinuron	32
B. Buturon	33
2. Untersuchungen zur Teratogenität	34
A. Monolinuron	34
B. Buturon	47
3. Aufzuchtversuche	59
A. Monolinuron	59
B. Buturon	60
4. Untersuchungen zur Mutagenität	66
a. Test auf dominante Letalfaktoren	66
A. Monolinuron	66
B. Buturon	78
b. Chromosomendarstellung aus Knochenmarkzellen	90
A. Monolinuron	93
B. Buturon	97
Diskussion	101
Literaturverzeichnis	

Einleitung

Neben Atemluft und Wasser sind Lebensmittel die wichtigsten Umweltfaktoren. Dabei interessiert besonders die Frage, ob mit den "Mitteln zum Leben" (BAUER, 1963) toxische, teratogene, mutagene oder cancerogene Stoffe in Form von Farbstoffen, Konservierungsmitteln, Saatbeizmitteln und Schädlingsbekämpfungsmitteln in den Organismus gelangen bzw. wo sie verbleiben. Bis 1955 waren bereits über 1000 chemische Stoffe registriert, die mit den Nahrungsmitteln inkorporiert werden können (ELCHHOLZ, 1956, 1957 ; SOUCI und MERGENTHALER, 1958). Inzwischen ist diese Zahl schätzungsweise um das Zehnfache höher. Die akute Intoxikation mit Lebensmittelzusatzstoffen ist selten und hat meist akzidentelle oder suizidale Ursachen. Viel gefährlicher ist die chronische Aufnahme von kleinen und kleinsten Mengen.

Schätzungen und statistische Untersuchungen in den USA zeigten, daß jährlich allein in den Vereinigten Staaten durch Unkraut- und Schädlingsbefall der Nahrungsmittelwirtschaft Verluste im Wert zwischen 2,4 und 4,5 Milliarden Dollar entstehen (KORSMO, 1932 ; CRAFTS und ROBBINS, 1965 ; MARTIN, 1968 ; STAPLEY und GAYNER, 1969). Man vermutet, daß etwa 35 % (= 300 Milliarden DM) der Weltjahresernte durch Schädlinge, Pflanzenkrankheiten und Unkräuter vernichtet werden (SHAW, 1964 ; ULLMANN, 1964 ; CRAMER, 1967 ; Auswertungs- und Informationsdienst Nr. 341 : BÄR und ROLL, 1972). Bei immer steigender Bevölkerungszahl kommt also dem Schutz der Kulturpflanzen eine steigende Bedeutung zu.

Nach ihrem Einsatzbereich unterscheidet man bei den Pestiziden Insektizide, Molluskizide, Nematozide, Akarizide, Rodentizide, Fungizide und Herbizide. Im Folgenden wird ausschließlich von der größten Gruppe, den Herbiziden, die Rede sein. Ihnen kommt besondere Bedeutung zu bei der Vernichtung und Unterdrückung der Gesamtflora (Wege, Plätze, Straßen, Bahngelände und Wasserwege) oder der gezielten, selektiven Unkrautvernichtung unter Schonung der vergesellschafteten Nutzpflanzen (ULLMANN, 1964). In einzelnen Fällen kann auch eine Wirkung auf die Nutzpflanze selbst erwünscht sein. So erleichtert z.B. die Abtötung des Kartoffelkrautes vor der Ernte nicht nur die Bergung der Wurzelknollen, sondern sie verhindert auch für den Fall eines Befalls der Pflanze durch *Phytophthora infestans* eine Infektion der Kartoffeln durch die Sporen des Kraut- und Knollenfauleerregers. Die Entlaubung von Baumwollpflanzen wird weitgehend praktiziert, um Pflückmaschinen einsetzen zu können (MARTIN, 1967).

Herbizide werden etwa seit der Jahrhundertwende angewendet. BONNET in Frankreich, BOLLEY in Amerika und SCHULTZ in Deutschland setzten Kupfersulfatlösung gegen Ackersenf ein. Eisen-II-sulfat wird noch heute dem Sand von Sportanlagen zugesetzt. RABATE verwendete verdünnte Schwefelsäure zur Entlaubung des Kartoffelkrautes. Trotz der hohen Toxizität für Warmblüter und trotz großer Instabilität wurden bis etwa 1930 Natriumchlorid, -chlorat, -arsenit und -cyanid, Kaliumchlorid und -rhodanid, Calciumcyanamid, Borsäuresalze, Arsenoxyd sowie Teer- und Petrolöle als Herbizide herangezogen (NUTTER et al., 1950 ; GOULD et al., 1950 ; ULLMANN, 1964 ; MARTIN, 1967). 1932 wurde als erstes definiertes,

organisches Herbizid das Dinitro-o-Kresol durch TRUFFAUT und PASTAC eingeführt. 1940 beobachtete TEMPLEMAN die phytotoxische Wirkung von Naphthylessigsäure gegenüber Ackersenf und seit Anfang der vierziger Jahre wurden 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) verwendet (ULLMANN, 1964 ; MARTIN, 1967).

Nach der Eintrittspforte der Substanzen unterscheidet man Boden- und Blattherbizide. Stoffe, welche diejenigen Pflanzenteile vernichten, mit denen sie in Berührung kommen, werden als Kontaktherbizide bezeichnet. Im Gegensatz dazu stehen solche Chemikalien, die ohne lokale Schädigungen vornehmlich von den Blättern aufgenommen und in der Pflanze transportiert werden. Sie sind "systemische Herbizide", "Wuchsstoffe" oder "translocated herbicides". Einige andere Stoffe, z.B. die Dipyridylium-Derivate, haben eine starke Kontaktwirkung und werden außerdem in der Pflanze transportiert (WEGLER und EUE, 1970).

Einen wesentlichen Anstoß erhielt die Herbizid-Entwicklung durch die Entdeckung des Pflanzenwuchsstoffes 3-Indoleessigsäure. Durch Synthetisierung verwandter Verbindungen erhielt man eine Reihe von Substanzen mit Wuchsstoff- und in höheren Konzentrationen herbizidalen Eigenschaften (z.B. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure). Weitere Forschungen zeigten, daß sehr unterschiedliche Verbindungsklassen als Pflanzenhormone vorkommen. Damit eröffnen sich viele Wege, diese Stoffe zu synthetisieren oder ähnliche Verbindungen aufzubauen. Denn nicht nur die echten Pflanzenhormone, sondern auch andersartige Verwandte können in das biochemisch-physiologische Geschehen in der Pflanze eingreifen. Wachs-

tumsregulatoren wie das Maleinsäurehydrazid bewirken z.B. Halmverkürzung beim Getreide, drosseln das Längenwachstum der Sojabohne, verhindern unerwünschte Seitentriebe bei der Tabakpflanze, reduzieren das Blühen beim Zuckerrohr und bewirken so einen höheren Zuckergehalt oder ermöglichen eine verstärkte Düngemittelaufnahme durch Verdickung der Stengel (AUDUS, 1964).

Heute sind eine ganze Reihe hochwirksamer und sehr selektiv wirkender Herbizide im Einsatz. Sie kommen als netzbare Pulver, Emulsionskonzentrate, Öllösungen, Staube oder als körnige Streumittel (Granulate) auf den Markt. Ihre Wirkungen auf den pflanzlichen Organismus sind sehr verschieden und in vielen Fällen noch nicht aufgeklärt. Die Phenolderivate entkoppeln die oxydative Phosphorylierung, so daß die Bildung energiereicher Phosphate in der Pflanze unterbleibt (WEGLER und EUE, 1970). Die Carbamate, Carbaminsäureester und Harnstoffherbizide wirken als Hemmer der Photosynthese durch Blockade der Hill-Reaktion (MORELAND und HILL, 1959 ; WESSELS und VEEN, 1956 ; ULLMANN, 1964 ; MARTIN, 1967) oder als Mitosegifte (IVES und BLACKMAN, 1949). Außerdem wurde eine Hemmwirkung auf die m-RNS-Synthese beobachtet (KEITT, 1967 ; WEGLER und EUE, 1970).

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure greift in das Auxin-Cytokinin-Gleichgewicht der Pflanze ein und bewirkt eine erhöhte Wasseraufnahme bzw. Wasserretention in den Zellen (CRAFTS, 1956, 1964). Die Wirkung von Maleinsäurehydrazid wird auf eine verminderte Heteroauxinbildung zurückgeführt (LEOPOLD und KLEIN, 1952) und der Einfluß auf die Indolylessigsäure soll auf einer oxydativen Zerstörung der beta-Indolylessigsäure in der Pflanze beruhen (WAYGOOD et al., 1956).

Die toxische Wirkung einer Substanz auf Tier und Mensch ist von physikalischen Phänomenen abhängig, die letztendes durch die Verteilung des Stoffes zwischen den verschiedenen Phasen an Grenz- und Oberflächen innerhalb des Organismus bestimmt werden. Es kann sich dabei um eine Membran handeln, an der das Gift durch interatomare Kräfte festgehalten wird und damit die Membran blockiert, oder es kann sich um Oberflächen von Enzymmolekülen handeln, auf denen das Gift von Gruppen festgehalten wird, die normalerweise zur Bildung der Enzym-Substrat-Komplexe herangezogen werden.

Man nimmt an, daß die toxische Wirkung vieler Herbizide für den tierischen und menschlichen Organismus auf einer Blockade der Cholinesterase-Synthese beruht. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung von Acetylcholin an den Synapsen und Endplatten und als Folge davon zu einem Zusammenbruch der Nerven- und Muskelreaktionen, der zum Tod führt (MARTIN, 1967 ; GRAHAM, 1971).

Um eine Gefährdung des Menschen nach Möglichkeit auszuschließen, ist es notwendig, mit Hilfe von Tierversuchen die toxische, teratogene, mutagene und cancerogene Wirkung eines Stoffes zu überprüfen.

Bei Untersuchung zur Teratogenität wird die Substanz einem graviden Kleinsäugetier zugeführt. Die Reaktion ist abhängig von der applizierten Dosis, der Entwicklungsphase des entstehenden Organismus, der Metabolisierung der Substanz im maternalen Stoffwechsel und dem Verhalten beim Überwinden der Plazentaschranke (KREYBIG, 1968). Welches die reagierenden embryonalen Systeme bestimmter Blasteme und Präblasteme sind, ist allerdings noch ungeklärt. Ob sie im

Zellkern (DNS) oder im Protoplasma (PNS, Mitochondrien, Proteine, Enzyme) lokalisiert sind, bleibt noch zu ergründen. Für die Auslösung von Mißbildungen ist die Empfindlichkeit einzelner Arten und Stämme sehr unterschiedlich, wie KALTER (1964) bei der Induktion von Gaumenspalten durch Cortison bei verschiedenen Mausestämmen zeigen konnte. Die pränatale Entwicklung der Maus dauert 19 ± 1 Tag. Der Begattungszeitpunkt des Mäuseweibchens läßt sich leicht ermitteln, da sich unmittelbar nach dem Deckakt ein Vaginalpfropf aus Spermien, Vaginalsekret und Schollenzellen bildet. Die Befruchtung findet meist schon im Ovidukt statt und es beginnen sofort die ersten Furchungsteilungen. Nach etwa 60 Stunden ist die Morula entstanden, die in den Uterus wandert, sich zur Blastocyste wandelt und sich am 5. oder 6. Tag der Trächtigkeit in die Schleimhaut einnistet. Danach entwickeln sich die Neuralrinne und die Somitenpaare, das Darmrohr und der Herzschlauch. Mit der Bildung der Primitivorgane ist die Frühphase der Entwicklung etwa am 9. Tag post conceptionem abgeschlossen. Die ventrale Krümmung, die Plazentation (Placenta hämochorialis) und der Nabelanschluß erfolgen etwa vom 9. - 10. Tag. Vom 10. - 12. Tag dauert die Embryonalphase. In dieser Zeit differenzieren sich das Gehirn und die primäre Gesichtsregion mit Augenblasen, Mandibularbogen, Riechgrube und Hörbläschen. Mit dem Abheben der Extremitätenknospen und der Streckung des Rumpfes beginnt die frühe Fetalphase, die etwa bis zum 14. Tag p.c. dauert. Hauptgeschehen in dieser Phase ist die Bildung eines Knorpelmodells des Skeletts, das zum Ende dieser Phase bereits mit der Ossifikation des Stammes beginnt. Gesichtsregion und Extre-

mitätenstrahlen werden weiter differenziert und die Schwimmhäute verschwinden. In der restlichen Zeit bis zum Wurftermin, der späten Petalphase, bilden sich die Proportionen und die spezifische Gestalt des Tieres aus (KREYBIG, 1968).

Wird ein teratogener Reiz im Blastocystenstadium gesetzt, so bewirkt er Mißbildungen der Primitivorgane und der Körpergrundgestalt, sofern die Blastocyste noch die Nidation erreicht. Im allgemeinen bewirken Reize zu diesem Zeitpunkt (und auch noch bis kurz nach der Nidation) den Tod des Keimes. Wenn sich in der Entocytenscheibe das Mesoderm absondert und aus den Organfeldern die Primitivorgane entstehen, ist der Keim besonders empfindlich gegen exogene Noxen. Die Wirkung scheint einem "Alles-oder-Nichts" - Gesetz zu folgen: entweder der Keim stirbt ab oder er entwickelt sich normal, allenfalls geringfügig geschädigt, weiter. Die empfindlichste Phase für die Auslösung von Mißbildungen wird mit der Plazentation und dem Nabelanschluß eingeleitet. Jetzt beginnt eine stürmische Organentwicklung und -differenzierung und dem Embryo strömen durch den Anschluß an den maternalen Kreislauf massiv die dem Muttertier verabreichten Substanzen zu. Wenn die befruchtete Eizelle als Blastocyste in die Uterusschleimhaut implantiert wird, scheint für kurze Zeit eine völlige Permeabilität von Mutter zum Keim zu bestehen. Danach ist die Penetration körperfremder Stoffe selektiv (DEGENHARDT, 1972). Beim teratologischen Experiment sind grundsätzlich drei Konsequenzen möglich: Fruchttod, Retardierung und Mißbildung. Unter Fruchttod versteht man das Absterben des Keimes in utero während eines Zeitpunktes der Fetogenese.

Was bis zur Nidation zugrunde gegangen ist, wird als prä-implantativer Verlust bezeichnet und errechnet sich aus der Differenz zwischen der Anzahl der Corpora lutea und der Anzahl der Implantationsstellen. Da diese frühen Entwicklungsstadien jedoch keine Spuren hinterlassen, die eine teratologische Beurteilung erlauben würden, ist eine Aussage über die teratogene Wirkung der Substanz in diesem Stadium nicht möglich. Nach der Nidation können verschiedene Stadien des Fruchttodes angetroffen werden: sehr früher Fruchttod hinterläßt nur eine stecknadelkopfgroße, nekrotische Masse in einer Einsenkung der Uterusserosa. Mittlere und späte Stadien können schon embryoähnliche Formen haben, befinden sich aber stets in autolytischer Resorption. Sie sind gelbgrau gefärbt und von weicher, schmieriger Konsistenz. Die Fruchtblase und die Plazenta haben jedoch annähernd normale Größe. Bei spätem Fruchttod - etwa ab 14. Tag p.c. - kommt es nicht mehr zur Resorption, sondern die toten Feten werden bei der Geburt abortiv ausgestoßen. Die Differenz zwischen der Anzahl der Implantationsstellen und der Anzahl ausgetragener, lebender Feten wird als postimplantativer Verlust bezeichnet. Eine Retardierung der Feten äußert sich in Untergewicht und Minderwuchs im Vergleich zu den Wurfgeschwistern bzw. zu den Kontrolltieren. Die Aussagekraft für eine toxikologische Beurteilung ist jedoch gering. Die Retardierungserscheinungen werden deshalb bei den folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Die Gesamtheit der Entwicklungsstörungen und Mißbildungen der Leibesfrucht wird als Kyematopathie bezeichnet. Blastopathien, die sich über das Embryonalstadium hinaus ent-

wickeln, sind beim Säuger äußerst selten (Duplizitäten, Sympodien, Sirenopodien). Störungen während der Nidation schädigen die Entocytenscheibe oder die Dezidua, wodurch die Nidation verhindert wird. Nach der Keimimplantation, also in der Zeit der Primitivorganogenese, ist die Empfindlichkeit gegenüber exogenen Noxen sehr groß, so daß neben mißgebildeten Feten häufig tote und resorbierte Früchte gefunden werden. Nach dem Nabelanschluß und der Plazentation beginnt die Hauptorganbildungsphase mit besonderer teratogener Empfindlichkeit. Diese ist zu Anfang der Embryonalphase unspezifisch, die späte Embryonal- und Fetalphase ist dagegen durch die Entstehung ganz spezifischer, in der Regel reproduzierbarer Syndrome gekennzeichnet.

Im Folgenden sind einige der möglichen Mißbildungen genannt:

Im Bereich des Zentralnervensystems treten am häufigsten Exencephalien auf. Anencephalien, Cyclocephalien und Myelocelen (Spina bifida) sind sehr selten. Häufiger treten Augenmißbildungen (Anophthalmie, Mikro- oder Makrophthalmie) und Fehlbildungen im Bereich des Intestinaltraktes auf (Exenterien, interventrikuläre Septumdefekte, Gefäßstenosen und Mißbildungen des Respirations- und Urogenitaltraktes). Für teratologische Routineuntersuchungen werden in erster Linie die Mißbildungen des Skeletts herangezogen. Die Kranialdefekte wurden bereits bei den Fehlbildungen des ZNS erwähnt. Am häufigsten sind die Aplasien von Os frontale und Os parietale bei Exencephalie, die Gaumenspalte, fehlendes Nasenseptum und die Mikrognathie. Ausgedehnte Spaltbildungen des Oberkiefers

(Wolfsrachen) sind sehr selten. Nicht selten sind Defekte der Wirbelsäule und des anhängenden Thoraxskeletts zu finden. Es sind Defizienzen, Aplasien und Synostosen einzelner Wirbelkerne, sowie schwere Deformationen der Achse (Lordose, Kyphose und Skoliose). Caudale Mißbildungen (z.B. Knick- und Stummelschwanz) sind meist nur in Verbindung mit Fehlbildungen der Lumbal- und Sakralregion zu finden. Embryopathien sind auch Rippen- und Sternaldefekte; Hypo- und Aplasien sind seltener als Synostosen, Gabelrippen und echte Deformationen ("gewellte Rippen"). Seit dem Einsatz der Thalidomide (Contergan) stehen Extremitätenmißbildungen im Vordergrund des Interesses. Sie zeichnen sich durch eine große Phasenspezifität aus. Am empfindlichsten sind die ersten Wachstumsphasen, wenn die Extremitätenknospen noch aus grobzelligem Bindegewebe bestehen. In der späten Phase der vorderen Extremitätenknospen entstehen sowohl brachiale Mißbildungen (Aplasien, Synostosen, Deformationen) als auch solche der Phalangen. Einwirkung der Noxe in der späten Phase des Knochenwachstums induziert nur noch distale Defekte (Oligo- und Ektrodaktylien). Erst während der Wachstumsphase der vorderen Extremitätenknospen heben sich die hinteren ab. Als Mißbildungen werden vorwiegend Dysplasien, wie z.B. Syndaktylien, Oligo- und Adaktylien gefunden. Dysgenesen der späten Fetalphase führen nicht mehr zu grobmorphologischen, sondern zu mikroskopisch-histologischen Veränderungen. Die Diagnose solcher Befunde ist schwierig und mit großem technischen Aufwand verbunden. Dagegen bieten sich die auch noch in der Fetogenese induzierbaren Skelettanomalien zur Beurteilung der Teratogenität einer Substanz geradezu an. Die präparative Technik

ist einfach und die Diagnose leicht zu stellen, da die meisten Skelettmißbildungen sehr augenfällig sind (FROHBURG und OETTEL, 1966 ; KREYBIG, 1965 ; 1968 ; LORKE, 1965).

Eine große Anzahl von Herbiziden wurden bereits auf ihre teratogene Wirkung geprüft. Aus der Gruppe der Phenol-derivate wurde das Tetrachlorphenol (TCP) von SCHWETZ und GEHRING (1973) untersucht. Trächtige Sprague-Dawley-Ratten erhielten die Substanz oral vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit. Die maximal tolerierte Dosis betrug 30 mg/kg/Tag, die Dosis ohne Wirkung 10 mg/kg/Tag. Bei den Feten wurden nur Retardierungserscheinungen am Schädelskelett aber keinerlei teratogene Effekte beobachtet. Pentachlorphenol (PCP) wurde ebenfalls von SCHWETZ und GEHRING (1973) getestet. Als wirkungslose Dosis für orale Applikation wurden 5 mg/kg/Tag und als maximal tolerierte Dosis 50 mg/kg/Tag bei Sprague-Dawley-Ratten ermittelt. Die Tiere wurden mit 30 mg/kg/Tag vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit behandelt. Neben subcutanen Ödemen wurden nur minimale Anomalien am Schädel, an den Rippen, Wirbeln und Brustbeinkernen gefunden. HINKLE (1973) verabreichte trächtigen Hamsterweibchen 1,25 - 20,0 mg PCP/kg vom 5. - 10. Tag der Trächtigkeit. Bei den drei höchsten Dosierungen kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl der Resorptionen und toten Feten. Mißbildungen wurden nicht beobachtet, obwohl mit Hilfe markierter Substanz gleiche PCP-Konzentrationen im maternalen und fetalen Blut gefunden wurden. GIBSON (1973) untersuchte Dinoseb auf seine teratogene Wirkung bei Swiss-Webster-Mäusen. Die orale Gabe von 5 - 20 mg/kg

vom 8. - 16. Tag p.c. bewirkte mit steigender Dosis nur vermehrte toxische Reaktionen bei den Muttertieren. Dagegen konnte durch intraperitoneale oder subcutane Injektion von 17 mg/kg am 10. - 12. Tag bzw. 14. - 16. Tag der Trächtigkeit auch eine Beeinflussung der Fetalentwicklung in Form von Resorptionen beobachtet werden. Die teratogene Wirkung der Substanz war sehr phasenspezifisch: nur bei i.p.- und s.c.-Applikation am 10. - 12. Tag wurden Atresiae anales und Acaudien gefunden. GIBSON und RAO (1973) stellten fest, daß die Dinoseb-Konzentration im fetalen Plasma nur etwa 2,5 % der des Muttertieres erreichte.

Die drei wichtigsten Phenoxyessigsäure-Derivate, die als Herbizide eingesetzt werden, sind Di-, Trichlorphenoxyessigsäure und Chlormethylphenoxyessigsäureäthylester. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) erwies sich als teratogen beim Hamster. COLLINS und WILLIAMS (1971) konnten mit 20 - 100 mg/kg Rippenmißbildungen induzieren. SCHWETZ et al. (1971) behandelten Sprague-Dawley-Ratten oral vom 6. - 15. Tag der Gravidität mit Dosen von 0 bis 87 mg 2,4-D/kg/Tag. Die Feten zeigten mit steigender Konzentration Retardierungserscheinungen. Mißbildungen konnten weder mit 2,4-D noch mit ihren Estern ausgelöst werden. Dagegen fanden KHEBRA und McKINLEY (1972) nach oraler Applikation von 150 mg/kg vom 6. - 15. Tag p.c. an Ratten eine Erniedrigung der Sektionsgewichte der Feten und eine signifikant erhöhte Anzahl von Gaumenspalten. Die umfangreichsten teratologischen Untersuchungen wurden bisher mit der 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) vorgenommen. Diese Substanz wurde mit 2,4-D kombiniert in großen Mengen im Vietnamkrieg als Defolians angewendet. Großtechnisch

hergestellte 2,4,5-T enthält stets als Verunreinigung einen geringen Anteil von Dioxin (= 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin = TCDBD) (BUU-HOI et al., 1971). Nach Injektion von 2,4,5-T wurde bei der Maus im Dottersackepithel eine selektive Anreicherung gefunden. In frühen Trächtigkeitsstadien passierte die Substanz die Plazenta nicht, später war sie auch im Fetus nachweisbar (LINDQUIST und ULLBERG, 1971 ; FANG et al., 1973). EMERSON et al. (1970, 1971) applizierten oral an Sprague-Dawley-Ratten 1 - 24 mg 2,4,5-T/kg mit einem Dioxingehalt von 0,5 ppm vom 6. - 15. Tag p.c. und an New Zealand-Kaninchen 10 - 40 mg/kg vom 6. - 18. Tag der Gravidität. Mißbildungen wurden nicht beobachtet. KHERA und MCKINLEY (1972) bestätigten die Höhe der wirkungslosen Dosis von etwa 25 mg/kg für Ratten. Selbst die orale Gabe von 100 mg 2,4,5-T/kg (Dioxingehalt < 0,5 ppm) vom 6. - 15. Tag p.c. war nicht toxisch für die Muttertiere. Hier lag jedoch die teratogene Schwellendosis. Mit steigender Konzentration sanken die Fetengewichte und die Anzahl toter Feten und solcher mit Skelettanomalien stieg an. COURTNEY et al., (1970) stellten fest, daß für C57BL- und AKR-Mäuse die orale Applikation von 113 mg/kg (Dioxingehalt 30 ppm) embryotoxisch, fetocidal und teratogen (Gaumenspalten) war. COLLINS und WILLIAMS (1971) untersuchten 2,4,5-T-Proben mit unterschiedlichem Dioxingehalt (0,1 - 2,9 ppm) auf ihre Teratogenität nach Gabe an Hamster vom 6. - 10. Tag p.c. 40, 80 und 100 mg/kg induzierten eine linear ansteigende Mißbildungsrate (fehlende Augenlider, Exencephalien), die eine gewisse Abhängigkeit vom Dioxingehalt aufwies. Diese Abhängigkeit konnte von

anderen Untersuchern nicht bestätigt werden. NEUBERT und DILLMANN (1972) hielten eine Potenzierung der teratogenen Wirkung von 2,4,5-T mit Dioxin für möglich, wenn die teratogene Dosis der einen Substanz mit der Schwellendosis der anderen kombiniert wird. Jedoch sind für einen deutlichen Effekt von 30 - 60 mg 2,4,5-T/kg mehr als 1,5 ppm Dioxin erforderlich. ROLL (1971) verabreichte NMRI-Mäusen orale Dosen von 35 - 130 mg/kg mit einem Dioxingehalt von 0,05 bis < 0,1 ppm vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit. Neben embryotoxischen Wirkungen (Resorptionen, tote Feten) beobachtete er eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Gaumenspalten. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Untersuchungen von BOEHRINGER, Ingelheim (1970). 2,4,5-T wurde vom 6. - 15. Tag der Gravidität verabreicht. Sowohl die Charge mit einem Dioxingehalt von 0,05 ppm als auch eine dioxinfreie Charge erzeugte bei einer Dosierung von 50 mg/kg bei Mäusen eine annähernd gleiche Anzahl von Gaumenspalten. Applikation beider Proben an Ratten (25 - 150 mg/kg zeigten die gleichen embryotoxischen Wirkungen ohne Mißbildungen. Die teratogene Unempfindlichkeit von Ratten gegen 2,4,5-T konnte von COURTNEY und MOORE (1971) bestätigt werden. Orale Gabe von 80 mg/kg (Dioxingehalt 0,5 ppm) und 100 mg/kg (Dioxingehalt 0,05 ppm) an Charles-River-Ratten bewirkte keine Mißbildungen. Dagegen erhöhte sich die Anzahl der Gaumenspalten signifikant nach subcutaner Injektion von 100 - 150 mg/kg (Dioxingehalt 0,5 ppm) vom 6. - 15. Tag p.c. in Charles-River- und DBA-Mäuse. C57BL-Mäuse waren gegen das Teratogen unempfindlich. NEUBERT und DILLMANN (1972) gaben dioxinfreies 2,4,5-T (20 - 120 mg/kg) vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit an NMRI-Mäuse. Die Anzahl

der Gaumenspalten erhöhte sich linear mit der Dosis. Mit einer einzigen hohen Dosis von 150 - 300 mg/kg ließ sich der gleiche Effekt erzielen. Ein Reaktionsmaximum wurde am 12. und 13. Tag p.c. beobachtet. VERRETT (1970) induzierte bei Hühnerküken nach Behandlung der Eier mit 2,4,5-T intestinale und subcutane Oedeme (chick edema disease), Augen- und Schnabelanomalien, Gaumenspalten und kurze, krumme Beine. Beim Affen (*Macaca mulatta*) konnten durch Applikation technischer 2,4,5-T (0,05 , 1,0 und 10 mg/Tier) vom 22. - 38. Tag der Trächtigkeit keine Mißbildungen ausgelöst werden (DOUGHERTY et al., 1973).

Chronische Kontamination mit 2,4-D und 2,4,5-T bewirkt beim Menschen die sog. "Chlorakne" mit Hyperpigmentation, Hirsutismus, Rötung der Conjunctiven und psychischen Störungen (POLAND et al., 1971 ; KIMBROUGH , 1972). YASUDA und MAEDA (1972) verabreichten Wistar-Ratten im Futter 40 - 2000 ppm (= 2,7 - 100 mg/kg) 4-Chloro-2-methylphenoxyessigsäureäthylester (MCPEE) vom 8. - 15. Tag der Trächtigkeit. Ab 1000 ppm verminderte sich das Sektionsgewicht der Feten und die Resorptionsrate stieg linear an. Mißbildungen lagen in Form von Gaumenspalten, Ventrikelseptumdefekten und Nierenanomalien vor.

Das Harnstoffderivat Athylenthioharnstoff wurde von KHERA (1973) trächtigen Rattenweibchen oral vom 6. - 15. Tag p.c. verabreicht. Es wurde eine dosisabhängige Mißbildungsrate ab 10 mg/kg/Tag beobachtet. Das Syndrom bestand aus Meningoencephalocelen, Meningorrhagien, Meningorrhoeen, Hydrocephalien, Spina bifida und short oder kinky-tail. Beim Kaninchen ließen sich durch Applikation vom 7. - 20. Tag p.c. keine Mißbildungen auslösen. Das Pyridinderivat

4-Amino-3,5,6-trichlorpicolinsäure (Picloram) wurde von THOMPSON et al. (1972) untersucht. Bei Sprague-Dawley-Ratten konnten nach oraler Gabe von 500 - 1000 mg/kg/Tag keine Mißbildungen beobachtet werden.

Das wichtigste Triazol-Herbizid ist 3-Amino-1,2,4-triazol (Amitrol). LANDAUER et al. (1971) injizierte die Substanz in die Dottersäcke von Hühnereiern. Eine wässrige Lösung von 20 mg/Ei zeigte eine hohe Toxizität, wenn die Eier erst kurze Zeit inkubiert waren. Die Toxizität nach 24 und 28 h Inkubationszeit war nur mäßig und wurde nach 96 h wieder sehr hoch. Die ausgebrüteten und geschlüpften Küken hatten Schnabelmißbildungen.

MEDVED et al. (1970) testete die Teratogenität von Athylpropylthiolcarbamat (Eptam) an Albinoratten. Ab 80 mg/kg wurde eine erhöhte Embryonaltoxizität bei gleichbleibenden Sektionsgewichten der Feten beobachtet. Die Substanz hatte keine teratogene Wirkung und rief nur degenerative Veränderungen der Leberzellen hervor. Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Injektion von 0,001 bis 10 mg/kg in 2 Tage alte Hühnerembryonen. Nach 0,001 mg/kg betrug die Mortalität 2 %, nach 10 mg/kg 83 %. Auch hier traten keine Mißbildungen auf.

Von den quartären Ammoniumbasen werden besonders CCC, Liguat und Paraquat als Entlaubungsmittel eingesetzt. JUSKIEWICZ et al. (1970) applizierte Hamstern oral Chlorcholinchlorid (CCC). 200 - 400 mg/kg erzeugten nach Gabe vom 7. - 9. Tag der Trächtigkeit eine linear dosisabhängige embryotoxische (Resorptionen und tote Feten) und teratogene Wirkung. Es wurden Exencephalien, Anophthalmien, Mikrophthalmien und Polydactylien beobachtet.

Athylen-4,4'-pyridyliumdibromid (Diquat) wurde von KHERA und WHITTA (1968) untersucht. Nach oraler Applikation von 7 mg/kg an trächtige Ratten vom 6. - 14. Tag p.c. verminderten sich die Sektionsgewichte der Feten und die Schädelknochen waren in ihrer Entwicklung retardiert. Die Erhöhung der Dosis auf 14 mg/kg bewirkte ebenfalls keine Mißbildungen, sondern unterbrach die Gravidität. Die parenterale Gabe von 20 - 80 mg 1,1'-Dimethyl-4,4'-dipyridyliumdichlorid (Paraquat) pro kg Tiergewicht erzeugte innerhalb von 12 - 24 h histopathologische Veränderungen an der Lunge (Oedeme und Nekrosen). Außerdem wurden verminderte Enzymaktivitäten gemessen (WITSCHI . 1973). FLETSCHER (1967) verfütterte an Hühner 40 ppm der Substanz. Die Gelege enthielten etwa 0,1 ppm/Ei. An den ausgebrüteten Küken konnte nur ein geringer toxischer und teratogener Effekt beobachtet werden. KHERA und WHITTA (1968) gaben Ratten 6,5 mg/kg i.p. vom 7. - 14. Tag der Trächtigkeit. Die Feten zeigten Rippenmißbildungen. Höhere Dosen unterbrachen die Trächtigkeit. FENELLY et al. (1968) berichteten von der akzidentellen Aufnahme eines Eßlöffels Paraquat durch eine gravide Frau. Trotz sofortiger Gabe von Fluorourazil als Antidot kam die Patientin nach mehreren Tagen ad exitum. Der 28-Wochen-Fetus zeigte keinerlei Gewebeanomalien.

Neben diesen Untersuchungen der Teratogenität stellt sich die Frage, ob Herbizide geeignet sind, die genetische Information zu verändern. Über die Mutationsauslösung bei Pflanzen berichtete OELKERS (1946). Er ließ Äthylurethan mit KCl 3 - 9 Tage mit dem Transpirationsstrom in abgeschnittenen Infloreszenzen von einigen Oenothera-Arten aufsteigen. In den Pollenmutterzellen fand er nach drei-

tägiger Gabe vom m/20 Äthylurethan + m/200 KCl 14% Translokationen. Nach Applikation an 9 Tagen stieg die Häufigkeit auf etwa 20 %. Nach verschiedenen Einwirkzeiten beobachtete er sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede der mutagenen Effekte. Die größte Zahl von Translokationen konnte im prämeiotischen Ruhestadium induziert werden. Die in diesem Stadium beeinflussten Zellen passierten alle anderen Zellstadien ohne besondere Beeinträchtigung. Erfolgte jedoch die Einwirkung vom späten Leptotän an, kamen multiple Zellschädigungen und radiomimetische Primäreffekte in großem Umfang zustande, so daß eine Chromosomenanalyse kaum mehr möglich war. Wirkte die Substanz auf das Pachytän oder auf spätere Stadien, fanden sich keine chromosomalen jedoch chromatidale Translokationen sowie Fragmente und Matrixverklebungen.

Für die Routineuntersuchung der Mutagenität von Substanzen an Laborsäugetern bieten sich u.a. der Test auf dominante Letalfaktoren und die Chromosomenanalyse aus den Knochenmarkzellen an. Im Dominant-Letal-Test werden männliche Tiere mit der Testsubstanz behandelt und danach mit unbehandelten Weibchen verpaart. Der prä- und besonders der postimplantative Verlust (Deziduomata und tote Feten) ist ein Maß für die Mutagenität der Testsubstanz. Die Methode hat die Vorteile, daß Mutationen in den Keimzellen induziert und nachgewiesen werden und außerdem die spezifische Sensibilität der Stadien der Spermiogenese bestimmt wird. Die dominanten Letalfaktoren, die zum Absterben der Embryonen führen, sind Indikatoren für genetische Veränderungen. Sie können vier Gruppen angehören: Die präimplantativen Letalfaktoren ergeben sich aus der Differenz zwischen

der Anzahl der Corpora lutea und der Anzahl der Implantationsstellen. Die frühembryonalen Letalfaktoren werden durch die frühen Resorptionsstadien ohne Plazentation repräsentiert. Die spätembryonalen Letalfaktoren werden durch die mittleren und späten Resorptionen mit mehr oder weniger differenzierten Feten und die fetalen Letalfaktoren durch die Anzahl der toten Feten dargestellt. (BATEMAN, 1973 ; EPSTEIN et al., 1972 ; RÖHRBORN, 1970).

Das Verpaarungsschema wird im allgemeinen sieben Wochen durchgeführt, um die Stadienspezifität der Substanz bei der Spermiogenese zu erfassen. Generell sind die postmeiotischen Stadien besonders empfindlich, so daß man sich eigentlich auf einen Dreiwochenversuch beschränken könnte. Eine spezifische Reaktion der Spermatogonien (meiotisches nondisjunction) ist aber nur durch eine Weiterführung der Verpaarung über 7 Wochen zu erfassen (BATEMAN, 1973). Durch Verpaarung in der ersten Woche nach der Substanzgabe wurden die Spermien im Vas deferens und Epididymis erfaßt. In der zweiten und dritten Verpaarungswoche werden die Stadien von den späten bis zu frühen Spermatiden und in der vierten und fünften Woche die der späten und frühen Spermatocyten betroffen. Wurden die definitiven Spermatogonien bzw. die Stammzellen durch die Applikation der Substanz geschädigt, so kann dies durch einen Anstieg der Anzahl dominanter Letalfaktoren in der sechsten bzw. siebenten Verpaarungswoche festgestellt werden (EHLING et al., 1968 ; EPSTEIN und SHAFNER, 1968 ; FISHBEIN et al., 1970 ; FROHBERG und BAUER, 1973 ; GENEROSO, 1969 ; HESS, 1973 ; KRAMER, 1973 ; LORKE, 1973 ; MACHEMER und LORKE, 1973 ; MACHEMER und STENGER, 1971 ; PARKIN et al., 1973 ; POHL,

1971 ; ROHRBORN, 1968, 1970, 1971).

Chromosomenuntersuchungen sind sowohl mit Hilfe von Lymphocyten- und Fibroblastenkulturen in vitro als auch mit der Darstellung von Chromosomen der Knochenmarkzellen in vivo nach Intoxikation des Tieres durchzuführen. Die Möglichkeit, in den Proerythrocyten des Knochenmarks Chromosomen in Metaphase darstellen zu können, wurde in letzter Zeit immer häufiger für in vivo-Tests auf mutagene Wirkung verschiedener Substanzen herangezogen. EGOZCÜ (1969) untersuchte den Einfluß von LSD auf Knochenmark- und Keimdrüsenzellen der Maus, PHILIP und JENSEN (1970) induzierten in vivo mit Benzol Chromosomenaberrationen an den Knochenmarkzellen der Ratte, DATTA et al. (1970) testeten mit Hilfe der Knochenmarkmethode Trenimon, Endoxan und Cytosan in vivo bei der Maus und SCHMID et al. (1971) untersuchten mit der gleichen Methode die Mutagenese durch Trenimon und Endoxan in vivo am Chinesischen Hamster. Bei allen Versuchen konnte ein signifikanter Anstieg der Chromosomenbrüche beobachtet werden. Über einen Ringversuch in vivo in verschiedenen Laboratorien mit p,p - DDT und TMP (Trimethylphosphat) an Ratten berichteten LEGATOR et al. (1973). Damit waren Aussagen über die Schwankungsbreite und die Reproduzierbarkeit der Präparations- und Auswertungsmethodik möglich. Die Mutagenität von Herbiziden reicht von der Wirkungslosigkeit bis zu Effekten, die sonst nur von "klassischen" Mutagenen erreicht werden.

GRANT (1973) verfolgte die einschlägige Literatur und berichtet in einer Übersichtsarbeit über Schädigungen der Zellwände durch Linuron und Trifluralin, die antinitotische Wirkung von Propanil und die Induktion von sticky-Effekten

durch 2,4-D , 2,4,5-T, Linuron, Chlorpropham, Dalapon und Pentachlorphenol. Propham und Chlorpropham bewirkten Despiralisation der Chromosomen; nach Gabe von Maleinsäurehydrazid wurden Chromatid- und Chromosomenbrüche sowie Rearrangements beobachtet. MCPA und Propham führten zur Bildung von Anaphase- und Telophasebrücken, tri- und tetrapolaren Anaphasen, lagging chromosomes und Cytomixis. Nach Applikation von Amitrol, 2,4-D , 2,4,5-T, Diallat, Pentachlorphenol und Triazin wurde Endopolyploidie beobachtet und nach Gabe von Chlorpropham, Dinoseb, Pentachlorphenol und Propanil wurden bi- und multinukleoläre Kerne ("Kleinkerne, Mikronuklei") gefunden.

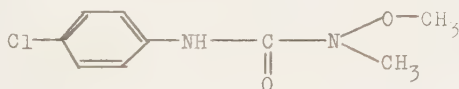
Bei der Untersuchung von Benzimidazolcarbamat fand STYLES (1973) eine signifikant erhöhte Zahl von Rückmutationen bei *Salmonella typhimurium* im host mediated-assay. Die Herbizide aus der Phenoxyessigsäure-Gruppe sind sehr intensiv untersucht worden. KOLBERG et al. (1971) setzten Mäusefibroblasten-monolayer-Kulturen 50 - 500 µg 2,4-D/ml Kulturflüssigkeit einen Tag nach Inkubationsbeginn zu. Ab 350 µg/ml wurde die Zellteilung vollständig gehemmt. Nach Absetzen der Substanz nach 12 Tagen Einwirkung teilten sich die Zellen wieder normal. DÄVRING und SUNNER (1971) setzten dem Futteragar von *Drosophila melanogaster* bis zu 250 ppm 2,4,5-T (Dioxingehalt < 0,1 ppm) zu. Schon kleine Dosen beeinflussten die frühe Oogenese und bewirkten Chromosomenaberrationen, die zur Sterilität der Fliegen führten. BUSELMAIER et al. (1973) untersuchten mit *Salmonella typhimurium* und STYLES (1973) mit *Serratia marcescens* 2,4-D , 2,4,5-T, MCPA und Pentachlorphenol auf ihre Mutagenität mit Hilfe des host mediated-assay bei der Maus. Die

Frequenz der Rückmutationen im Minimalmedium lag im Bereich der Kontrollwerte. Auch der Dominant-Letal-Test nach intra-peritonealer Injektion von 2,4,5-T und MCPB an Mäusen verlief negativ. CARLISLE (1968) beobachtete eine Unterdrückung der Meiose in den Keimzellen von Heuschrecken nach Begiftung mit Chlorcholinchlorid. Da CCC im Boden und in der Pflanze sehr beständig ist, könnte auch für den Menschen ein Risiko bestehen. Ernte- und Feldarbeiter werden oft unabsichtlich mit großen Herbizidmengen kontaminiert (Hautkontakt, Inhalation und orale Aufnahme). OZEIZEL et al. (1973) fanden bei 31 Patienten mit akuten Vergiftungen durch Phosphorsäureester-Herbizide eine signifikante Erhöhung der Anzahl von Metaphasechromosomen mit Brüchen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen BAO et al. (1974) bei Personen, die entweder mit diesen Verbindungen Suizid versucht oder infolge von Nichtbeachtung der Arbeitsschutzmaßnahmen eine Vergiftung erlitten hatten. Die Blutproben wurden 30 - 180 Tage nach der Vergiftung entnommen. Bei Patienten mit akuter Intoxikation konnte eine vorübergehende, signifikante Zunahme in der Häufigkeit der Chromosomenbrüche und der stabilen Aberrationstypen beobachtet werden. YODER et al. (1973) berichteten über Untersuchungen an 42 Anwendern von Pestiziden im Vergleich mit 16 Kontrollpersonen. Während der Applikationszeiträume der Herbizide 2,4-D, 2,4,5-T, Amitrol, Dicamba, Chlorpropham, Alachlor, Trifluralin, Picloram und Diquat wurden Metaphasechromosomen aus Blutkulturen der Probanden analysiert. Es wurde eine signifikante Zunahme der Chromatidbrüche gefunden.

Material und Methode

1. Versuchstiere und Substanzen

Für die Versuche standen NMRI-Mäuse der Zentralen Versuchstieranstalt des Bundesgesundheitsamtes zur Verfügung. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn etwa 8 - 10 Wochen alt und wogen zwischen 30 und 40 g. Sie wurden unter konstanten Bedingungen gehalten und erhielten als Futter Altromin R und Wasser ad libitum. Bei den Versuchen zur Teratogenität, den Aufzuchtversuchen und den Tests auf dominante Letalmutationen wurde das Gewicht der Muttertiere täglich protokolliert. Monolinuron* (Reinheit 95 %) ist ein selektives Voraufbauherbizid, das durch die Wurzeln und Blätter aufgenommen wird und die Photosynthese hemmt. Es wird als 50%iges Spritzpulver (Handelsname ARESIN) gegen Unkräuter in Kartoffel-, Spargel- und Weinkulturen angewendet. 1972 wurden in der Bundesrepublik Deutschland etwa 120 t auf einer Fläche von 58.000 ha ausgebracht. Dem farblosen Pulver kommt folgende Struktur zu:

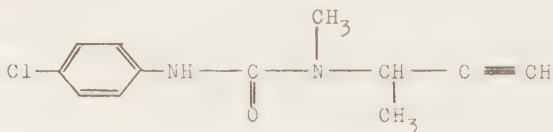


N-(4-Chlorphenyl)-N'-methyl-N-methoxyharnstoff

*Monolinuron wurde uns freundlicherweise von den Farbwerken HOECHST AG., Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Wir danken dafür herzlich.

Monolinuron hat ein Molekulargewicht von 214,5 , schmilzt bei 79 - 80°C und ist in Wasser wenig (580 ppm bei 20°C), in organischen Lösungsmitteln sehr gut löslich.

Buturon* (Reinheit 94 %) ist ein Herbizid gegen flachkeimende Unkräuter (Windhalm) auf Feldern mit Wintergerste und Winterweizen sowie gegen keimende Unkräuter im Beerenobst- und Weinbau. 1972 wurden in der Bundesrepublik Deutschland auf 19.000 ha etwa 38 t ausgestreut. Buturon kommt als 50%iges Spritzpulver in den Handel (Handelsname EPTAPUR) und hat folgende Struktur:



N-(4-Chlorphenyl)-N'-methyl-N'-isobutinylharnstoff

Der Schmelzpunkt von Buturon liegt bei 145 - 146°C und das Molekulargewicht beträgt 236,7. Es ist in Wasser nur wenig (0,003 g/100 g), in Äther mäßig (2,2 g/100 g) und in Aceton gut löslich (27,9 g/100 g). (PERKOW, 1971).

Beide Substanzen wurden fein gemörsert, in Oleum Arachidis (DAB 7) suspendiert und während der Applikation mit einem Magnetrührer homogenisiert. Die Versuchstiere erhielten diese Suspension, die Kontrolltiere Arachisöl per Schlundsonde.

*Buturon wurde uns von der BASF, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt. Wir danken dafür herzlich.

2. Untersuchungen der akuten Toxizität

Um eine grundsätzliche Aussage über die Toxizität bei-
der Substanzen machen zu können, wurde zunächst die mitt-
lere letale Dosis (LD_{50}) für NMRI-Mäuse bestimmt.

Mindestens fünf Gruppen zu je 15 Tieren erhielten eine
einmalige orale Gabe der jeweiligen Substanz. Danach
wurden die Tiere eine Woche lang beobachtet und der Pro-
zentsatz verstorbener Tiere festgestellt. Ein WANG 700
Series, programmiert nach FINNEY (1971), errechnete den
 LD_{50} -Wert und druckte die Probit-Gerade aus.

3. Untersuchungen zur Teratogenität

Trächtige NMRI-Weibchen erhielten täglich 0,5 ml einer
entsprechenden Öl-Substanz-Suspension per Schlundsonde
vom 6. - 15. Tag der Gravidität. Am 18. Tag der Trächtig-
keit wurden die Muttertiere getötet und die Feten durch
Laparotomie gewonnen. Gleichzeitig wurden beide Ovarien
zur Zählung der Corpora lutea entnommen. Diese sind mehr
oder weniger deutlich an der Ovaroberfläche als hellrosa
bis dunkelrote, halbkuglige Erhebungen zu erkennen. Der
Uterusinhalt wurde untersucht auf die Zahl der Implan-
tationsstellen, Resorptionen und Totgeburten und die per
sectio entbundenen, lebenden Feten auf grobe Mißbildun-
gen (Exencephalien, Gaumenspalten, Exenterien u.ä.) in-
spiziert. Der präimplantative Verlust wurde in % der Cor-
pora lutea, der postimplantative Verlust und die Anzahl
der toten und mißgebildeten Feten in % der Implan-
tationsstellen angegeben. Die Aufarbeitung zur Darstellung des
Skeletts erfolgte nach der Methode von DAWSON (1926) :

a) Fixieren der Feten in 70 %igem Äthanol mindestens 24 h.

- b) 24 - 48 h in 2 %ige KOH, danach waschen in Aqua dest.
- c) 24 - 36 h in 1 %ige KOH + 1 %ige alkoholische Alizarinlösung, danach waschen in Aqua dest.
- d) Entwässern und Klären in aufsteigender Glyzerinreihe (30, 60, 90 und 100 %), jeweils zwei Tage.

Die Weichteile blieben nur als gallertige Masse zurück, während die ossifizierten Skeletteile dunkelrot-violett angefärbt waren. Die Inspektion der Feten erfolgte unter einer binokularen LEITZ-Stereolupe bei 10 - 40facher Vergrößerung. Die Fotografien wurden mit Hilfe eines LEITZ-TESSOVAR (Vergrößerung 1 - 12fach) bei Durch- bzw. Auflicht angefertigt. Die Sektionsgewichte der Feten wurden mit den t-Test, alle übrigen Befunde mit dem χ^2 -Verfahren verglichen.

4. Aufzuchtversuche

Als Ergänzung der Untersuchungen zur Teratogenität wurde ein Aufzuchtversuch durchgeführt, um auch die postnatale Entwicklung der Jungtiere erfassen zu können. Bei gleicher Vorbehandlung wie in den Versuchen zur Teratogenität wurden die trächtigen Muttertiere nicht schnittentbunden, sondern es wurde der normale Wurftermin abgewartet. Nach der Geburt wurden die Würfe auf Totgeburten kontrolliert, alle Feten gewogen und auf Gaumenspalten inspiziert. Während der Lactationsperiode (3 Wochen) wurde täglich die Mortalität bestimmt. Danach wurden die Jungtiere abgesetzt und die Muttertiere getötet. Die herauspräparierten Uteri wurden etwa 1 Minute in eine (1:1) mit Wasser verdünnte Ammoniumsulfid-Lösung gelegt. Da in den Implantationsstellen selektiv Eisen eingelagert wird, läßt sich deren Zahl

noch nachträglich durch die Bildung von schwarzem Eisensulfid bestimmen und so die Gesamtmortalitätsrate berechnen.

5. Untersuchungen zur Mutagenität

a) Test auf dominante Letalfaktoren

Männliche NMRI-Mäuse erhielten 5 Tage hintereinander eine tägliche orale Gabe von 0,5 ml Erdnußöl (Kontrolle) bzw. der entsprechenden Testsubstanz-Suspension. Von der darauf folgenden Woche an wurde je ein Männchen mit zwei bzw. drei Weibchen pro Woche verpaart. Zweimal am Tag wurden die begatteten Weibchen, die an einem Vaginalpfropf erkennbar waren, herausgesucht und einzeln weitergehalten. In jeder neuen Woche wurden virginelle Weibchen nachgesetzt, so daß das Verpaarungsverhältnis erhalten blieb. Pro Woche und pro Konzentration wurden 15 männliche und 45 weibliche Tiere eingesetzt. Das Schema wurde sieben Wochen nach der Substanzgabe an die Männchen durchgeführt, um die Stadienspezifität der Substanzen bei der Spermiogenese zu erfassen.

Zwischen dem 13. und 15. Tag der Trächtigkeit wurden die Weibchen getötet und sezziert. Die Ovarien wurden zur Zählung der Corpora lutea herauspräpariert und die Zahl der Implantationsstellen und die Zahl der lebenden und toten Implantate festgestellt. Aus diesen Werten wurden folgende Parameter berechnet: Die Befruchtungsquote ergab sich aus dem Verhältnis der Anzahl der verpaarten Weibchen zu der Anzahl der Weibchen mit Implantationsstellen im Uterus. Der präimplantative Verlust, d.h. der Verlust ovulierter Follikel bis zum Zeitpunkt der Nidation (6. Tag p.c.),

errechnete sich aus der Differenz zwischen der Anzahl der Corpora lutea und der Anzahl der Implantationsstellen im Uterus. Der postimplantative Verlust, d.h. der Verlust nach der Miation bis zum Sektionstermin, wurde durch das Verhältnis von lebenden Implantaten/Deziduomata und tote Feten bestimmt, bezogen auf die Zahl der Gesamtimplantationsstellen. Die Deziduomata schlossen sowohl die frühen als auch die späten Resorptionen ein. Frühe Resorptionen sind dunkelrote bis braune nekrotische Gebilde aus hämorrhagischem Material, die keine fetale Gestalt haben. Späte Resorptionen bestehen aus Plazenta und Fruchtblase, die einen autolytischen Fetus enthält. Dieser ist bleich und grau und oft von schmieriger Konsistenz. Tote Feten haben eine annähernd normale Größe und Konsistenz, sind jedoch schlecht durchblutet und das Fruchtwasser ist oft trübe.

Die erhaltenen Sektionsbefunde wurden mit dem χ^2 -Verfahren verglichen und der prä- und postimplantative Verlust sowie der Gesamtverlust, d.h. die Differenz zwischen der Anzahl der Corpora lutea und der Anzahl der Implantationsstellen, wurde graphisch gegen die Dosis aufgetragen. Aus dem Vergleich zwischen dem Gesamtverlust der Kontroll- und der Versuchsgruppe wurde die Letalität errechnet:

$$\text{Letalität} = 1 - \frac{\text{lebende Implantate/Corpora lutea (Versuch)}}{\text{lebende Implantate/Corpora lutea (Kontrolle)}}$$

b) Chromosomendarstellung aus den Knochenmarkzellen

Die Tiere erhielten eine ein- bzw. im Abstand von 24 Stunden zweimalige orale Gabe von Arachisöl (Kontrolle) bzw. der entsprechenden Substanzsuspension. 6, 16, 24 bzw. 48 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere getötet, nachdem sie 3 Stunden vor dem Töten 4 mg Colchicin/kg in wässriger Lösung (DAB 7) intraperitoneal erhalten hatten. Das Mark eines Oberschenkelknochens wurde mit einer frisch angesetzten 1 %igen Natriumcitratlösung (5 ml) von 37°C in ein Zentrifugengläschen ausgespült, und 20 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation bei 700 - 800 Upm (ca. 5 Minuten) und Absaugen des Überstandes wurde das Sediment mit 0,5 ml Hank's Lösung resuspendiert und sofort mit mindestens 2 ml frisch angesetztem, kalten Fixativ (Methanol-Eisessig 3:1) fixiert. Nach 30 min - 1 h wurde die Zellsuspension noch zweimal mit einer frischen Fixativlösung gewaschen und nach Lagerung über Nacht (bei 4°C) auf einen sauberen, eisgekühlten, feuchten Mattschildobjektträger aufgetropft und luftgetrocknet. Die Färbung erfolgte 20 min mit verdünnter Giemsa-Lösung (10 ml der Stammlösung + 100 ml 0,025 M Phosphatpuffer). Danach wurden die Präparate in Aqua dest. getaucht und nochmals getrocknet. Sie wurden mit Aceton, Aceton-Xylol (1:1) und Xylol (je 2 Minuten) entwässert und mit Eukitt eingedeckt (BADR und BADR, 1970 ; BAUER und FROHBURG, 1972 ; DATTA et al., 1970 ; EGUZCUE, 1969 ; GREEN et al., 1973 ; GEBHART und WISSMÜLLER, 1973 ; HOLDEN et al., 1973 ; JENSEN, 1972 ; LEGATOR, 1973 ; MANYAK und SCHLEIERMACHER, 1973 ; NIKOLS, 1972 ; NOMBELA und MURCIA, 1972 ; PHILIP

und JENSEN, 1970 ; RAY et al., 1973 ; SCHMID et al., 1971 ; SCHNEDL, 1971 ; SEMPINSKA, 1973).

Die Ermittlung des Mitoseindex erfolgte bei 450facher Vergrößerung der Präparate durch Bestimmung des Anteils an Zellen in Mitose bei 1000 - 2000 Zellen/Tier. 50 gut differenzierte und ausgebreitete Metaphaseplatten pro Tier wurden in Ölimmersion mit 1650 - 2000facher Vergrößerung eingestellt, beurteilt und zur Dokumentation fotografiert. Wir werteten die Negative mit Hilfe eines Lesegerätes aus und beurteilten folgende Aberrationsarten:

1. Achromatische Läsionen (AL). Bei diesen "gaps" oder "lokalen Achromasien" handelt es sich um ungefärbte Regionen, die entweder die Einzelchromatide oder äquival lokal beide Chromatiden betreffen.
2. Chromatidaberrationen. Zu ihnen werden gerechnet:
 - a. Chromatidbrüche (B') sind Deletionen mit einer echten Diskontinuität eines Chromatids. Das Bruchstück ist meist an homologer Stelle mit der Schwesterchromatide gepaart, nicht selten an der gegenüberliegenden Seite.
 - b. Isochromatidbrüche (B'') liegen vor, wenn homologe Bezirke beider Chromatiden gebrochen sind. Dabei entsteht ein Doppelfragment ohne Centromer.
 - c. Chromatidtranslokationen (RB') mit ihren verschiedenen Translokationsfiguren sind die Folge der Reunion von Brüchen in mehreren Chromosomen. RB' zwischen homologen Chromosomen mit den Bruchstellen an homologen Stellen beider Chromosomen werden als somatisches crossing over, Translokationen zwischen nicht-homologen Chromosomen oder zwischen homologen Chromosomen an nicht-homologen Bezirken als nicht-homologes

crossing over bezeichnet.

3. Chromosomenaberrationen.

- a. Dizentrische Chromosomen entstehen nach Chromosomenbrüchen und Reunion der jeweils ein Centromer tragenden Teile der Schwesterchromosomen vor der DNS-Replikation.
- b. Ringchromosomen können als Folge von Chromosomenbrüchen entstehen, indem die Bruchenden des meist größeren interkalaren Segments verschmelzen.

(RIEGER und MICHAELIS, 1967 ; SCHLEIERMACHER, 1971 ; OBE et al., 1971 ; HERHA et al., 1974).

Neben den Chromosomenaberrationen können noch in Abhängigkeit vom einwirkenden Agens, seiner Konzentration und seinen Einwirkbedingungen mehr oder weniger ausgeprägt folgende Effekte auftreten:

1. Zeitliche Verzögerung des Zellzyklus. Der Anteil der in Mitose befindlichen Zellen sinkt nach der Behandlung ab, wenn er mit dem Mitoseindex unbehandelter Zellpopulationen verglichen wird.
2. Chromosomale Pyknoseeffekte. Diese ausnahmslos bei sehr hohen Agenskonzentrationen auftretenden "stickiness"-Effekte sind die Folge einer induzierten Änderung der Oberflächenbeschaffenheit der Chromosomen und einer Zerstörung der chromatidialen Feinstruktur, so daß die scharfen Grenzen verloren gehen und die Chromosomen miteinander "verkleben".
3. Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit, Reproduktionsleistung und Fertilität der Tiere. Diese Parameter werden mit dem Dominant-Letal-Test erfaßt.

Ergebnisse

1. Untersuchungen der akuten Toxizität (LD_{50})

A. Monolinuron

Acht Gruppen zu je 15 weiblichen NMRI-Mäusen (Durchschnittsgewicht 40 g) wurden einmalig mit 750 mg/kg - 3000 mg/kg oral behandelt. Die Konzentrationen und die Anzahl innerhalb einer Woche gestorbenen Tiere sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Konzentration (mg/kg)	Zahl der Tiere (n)	verstorbene Tiere	
		(n)	(%)
750	15	1	6,7
1000	15	1	6,7
1250	15	3	20,0
1500	15	2	13,4
1750	15	3	20,0
2000	15	4	26,7
2500	15	10	66,7
3000	15	9	60,0

Tabelle 1 : Mittlere letale Dosis (LD_{50}) von Monolinuron für virginelle NMRI-Mäuse

Das Beobachtungsmaterial war homogen ($\chi^2 = 4,44$; $f = 6$; $P = 0,382$) und die slope function S betrug 2,1409. Daraus ergab sich eine LD_{50} für Monolinuron nach oraler Applikation an weibliche NMRI-Mäuse von 2687 mg/kg.

B. Buturon

Fünf Gruppen zu je 15 weiblichen NMRI-Mäusen (Durchschnittsgewicht 40 g) erhielten eine einmalige orale Gabe von 500 mg/kg bis 2500 mg/kg. Die applizierten Dosen und die Zahl der nach einer Woche verstorbenen Tiere sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Konzentration (mg/kg)	Zahl der Tiere (n)	verstorbene Tiere	
		(n)	(%)
500	15	0	0
1000	15	1	6,7
1500	15	4	26,7
2000	15	10	66,7
2500	15	12	80,0

Tabelle 2 : Mittlere letale Dosis (LD_{50}) von
Buturon für virginelle NMRI-Mäuse

Das Tiermaterial war ebenfalls homogen ($\chi^2 = 0,49$;
 $f = 3$; $P = 0,079$) und die slope function S betrug
1.9380. Daraus ergab sich eine LD_{50} für Buturon nach
oralen Gabe an weibliche NMRI-Mäuse von 1778 mg/kg.

Als primär-toxische Erscheinungen zeigten die Tiere
beider Versuche in den hohen Konzentrationsgruppen
Fellrädigkeit, Hypothermie, schlaffe Lähmungen und
Blutungen der Augen- und Nasenschleimhäute.

2. Untersuchungen zur Teratogenität

A. Monolinuron

Die Kontrolltiere erhielten 0,5 ml Oleum Arachidis und die Versuchstiere 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 800 oder 1000 mg Monolinuron/kg Körpergewicht oral in einer Öl-Substanz-Suspension vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

Die Substanzgabe wurde von den Tieren bis zu einer Dosierung von 300 mg/kg gut vertragen. Bei höheren Konzentrationen traten sich die toxischen Reaktionen: Fellrändigkeit, verringerte Motorik und Augenauffektionen. Bei Applikation von 800 mg/kg und 1000 mg/kg betrug die Mortalität bei den Muttertieren etwa 50 %.

Die Gewichtszunahme der Tiere während der Trächtigkeit ist aus der Tabelle 3 und der graphischen Darstellung Abb. 4 zu entnehmen. Bis zu einer Dosierung von 500 mg/kg konnte keine Beeinflussung der Gewichtszunahme der Muttertiere während der Gravidität beobachtet werden. Die Applikation von 800 mg/kg bzw. 1000 mg/kg verringerte die tägliche Zunahme kontinuierlich und signifikant etwa vom 12. Tag p.c. an. Das Endgewicht dieser Tiere lag am Sektionstermin (18. Tag) um 9 g bzw. 10 g niedriger als das der Kontrolltiere ($P = 10^{-10}$).

Die Sektionsbefunde sind in den Tabellen 4a und 4b zusammengefaßt. Die präimplantativen Verluste aller Versuche lagen im physiologischen Schwankungsbereich und zeigten keine nennenswerten Abweichungen vom Kontrollwert. Der postimplantative Verlust unterschied sich

bis zu der Dosis von 500 mg/kg nicht signifikant von den Kontrollwerten. Er schwankte zwischen etwa 10 % und 15 % ; den Hauptanteil hatten die frühen Resorptionsstadien mit etwa 7 % - 9 %, danach folgten die späten Resorptionsstadien mit 1 % - 7 % und die toten Feten mit 1 % - 2,5 %. Nach Applikation von 800 mg/kg und 1000 mg/kg wurde eine signifikante Erhöhung des postimplantativen Verlustes auf 34,9 % bzw. 33,5 % beobachtet. Damit erniedrigte sich die Zahl der ausgetragenen, lebenden Feten von etwa 85 % - 90 % bei den Kontrolltieren auf 65,1 % bzw. 66,5 % bei den Tieren, die 800 mg/kg bzw. 1000 mg Monolinuron/kg erhalten hatten. Betroffen waren ausschließlich die Entwicklungsstadien vor der Plazentation, so daß sich der Anteil der frühen Resorptionsstellen auf 22,1 % bzw. 28,4 % erhöhte. Die Anzahl der späten Resorptionsstadien und der toten Feten war gegenüber den Kontrolltieren nicht signifikant erhöht. Die Sektionsgewichte der Feten in der Kontrollgruppe betrugen am 18. Tag der Trächtigkeit durchschnittlich 1,17 g ($\pm$ 0,06 g) und die Gabe von 25, 50 oder 100 mg/kg beeinflusste diesen Parameter nicht. Ab 200 mg/kg konnte eine Senkung der Fetengewichte beobachtet werden ($P = 0,0002$). Die Sektionsgewichte erniedrigten sich dosisabhängig von 1,08 g bei 200 mg/kg auf 0,74 g ($\pm$ 0,08 g) bei 1000 mg/kg (Abb. 2).

Die Feten wurden sowohl nach der Sektion als auch nach der Aufarbeitung und der Skelettfärbung auf Mißbildungen untersucht (Tabelle 4b). Neben Gaumenspalten wurden Exencephalien, Exenterien, Mikrognathien, gewellte oder

verwachsene Rippen, Skoliosen und hypoplastische Oberkiefer gefunden (Abb. 4 - 11). Da der MMKI-Stamm spontan zur Bildung von Gaumenspalten neigt, wurden bei 1,0 % der Kontrolltiere diese Mißbildungen des Os palatinum gefunden. Nach Applikation von 25 mg/kg bzw. 50 mg/kg konnte keine signifikante Erhöhung der Anzahl der Gaumenspalten beobachtet werden. Die Gabe von 100 mg Monolinuron/kg führte zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl der Gaumenspalten auf 3,9 % ($P = 0,005$). Mit steigender Konzentration der Substanz kam es zu einer dosisabhängigen Vermehrung dieser Mißbildung. Die Feten, deren Muttertiere 1000 mg/kg erhalten hatten, zeigten 35,4 % Gaumenspalten (Abb. 4).

Exencephalien, Exenterien, Mikrognathien und Skoliosen traten nur vereinzelt auf und ihre Anzahl wich nicht signifikant von den Kontrollwerten ab. Bei den gewellten oder verwachsenen Rippen konnten nach Gabe von 400 mg/kg bzw. 800 mg/kg eine signifikant erhöhte Mißbildungsrate beobachtet werden: 4,1 % bzw. 2,5 % ($P = 0,0027$). Die Anzahl der hypoplastischen Oberkiefer zeigte dagegen bei den beiden hohen Konzentrationen (800 mg/kg bzw. 1000 mg/kg) eine Dosisabhängigkeit. Die Applikation von 500 mg/kg erhöhte die Häufigkeit dieser Mißbildungen signifikant auf 4,4 % ($P < 0,0027$) und die Gabe von 1000 mg/kg vermehrte die Anzahl der hypoplastischen Oberkiefer auf 11,7 %.

Um die Phasenspezifität von Monolinuron auf die Fetogenese der Maus zu prüfen, wurde die Substanz am 10. und

11. Tag, am 12. und 13. Tag sowie vom 10. - 13. Tag der Trächtigkeit - d.h. mit dem Beginn der Embryonalphase nach der Plazentation - verabreicht. Die Dosis betrug bei allen Versuchen 500 mg Monolinuron/kg Tiergewicht. Die Sektionsbefunde sind in Tabelle 4c zusammengefaßt. Die präimplantativen Verluste aller Versuche wiesen keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Kontrollwert auf. Die Applikation von 500 mg/kg am 10. und 11. Tag bzw. am 12. und 13. Tag p.c. beeinflussten auch nicht den postimplantativen Verlust, d.h. die Resorptionen und toten Feten. Lediglich das durchschnittliche Sektionsgewicht der Jungtiere erniedrigte sich signifikant nach Gabe der Substanz am 12. und 13. Tag der Trächtigkeit auf 1,07 g ($\pm$ 0,05 g) gegenüber 1,17 g ($\pm$ 0,06 g) der Feten in der Kontrollgruppe ($P = 0,0002$). Wurden 500 mg Monolinuron/kg vom 10. - 13. Tag der Gravidität gegeben, konnte eine signifikante Zunahme der frühen Resorptionen von 8,8 % (Kontrolle) auf 14,1 % beobachtet werden, so daß auch der postimplantative Verlust auf 15,5 % anstieg. Der Einfluß der Substanzgabe vom 10. - 13. Tag p.c. auf die Gewichtsentwicklung der Feten war nicht so gravierend wie die Gabe am 12. und 13. Tag.

Eine Phasenspezifität von Monolinuron auf die Embryonalentwicklung konnte nicht nachgewiesen werden. Lediglich nach Verabreichung von 500 mg/kg am 12. und 13. Tag p.c. konnte eine geringe Erhöhung der Anzahl der Gaumenspalten auf 4,1 % beobachtet werden ($P < 0,005$). Andere Mißbildungen (Exencephalien, Exenterien und gewellte oder verwachsene Rippen) traten nur vereinzelt auf.

Tag der Trächtigkeit																			
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	
1000	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	12,6	15,1	16,5	17,9	23,3	
2000	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	12,4	14,9	17,0	18,9	23,3	
3000	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,2	7,1	10,0	11,8	13,0	16,1	18,0	21,5	
4000	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,1	5,0	9,0	11,5	13,0	16,7	18,8	21,7	
5000	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,6	4,4	10,0	11,7	14,7	16,0	21,9	20,8	
6000	0,3	0,7	1,0	1,3	1,7	2,0	2,3	2,7	3,0	3,4	3,7	3,6	10,6	12,2	14,0	15,4	20,2	21,1	
7000	0,2	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2,0	2,3	2,6	2,9	3,2	3,4	10,7	12,5	14,2	16,1	20,1	20,0	
8000	0,1	0,3	0,5	0,8	1,1	1,4	1,7	2,0	2,3	2,6	2,9	3,2	9,5	10,3	11,8	13,1	14,4	13,3	
10000	0,0	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5	1,6	1,8	8,4	9,4	10,3	12,1	13,0	13,3	

Tabelle 3: Gewichtszunahme (in g) gravider HMJ-1-Mäuseweibchen nach oraler Gabe von 0, 15, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 und 1000 mg Monolinuron/kg v.m.G. - 14. Tag der Trächtigkeit

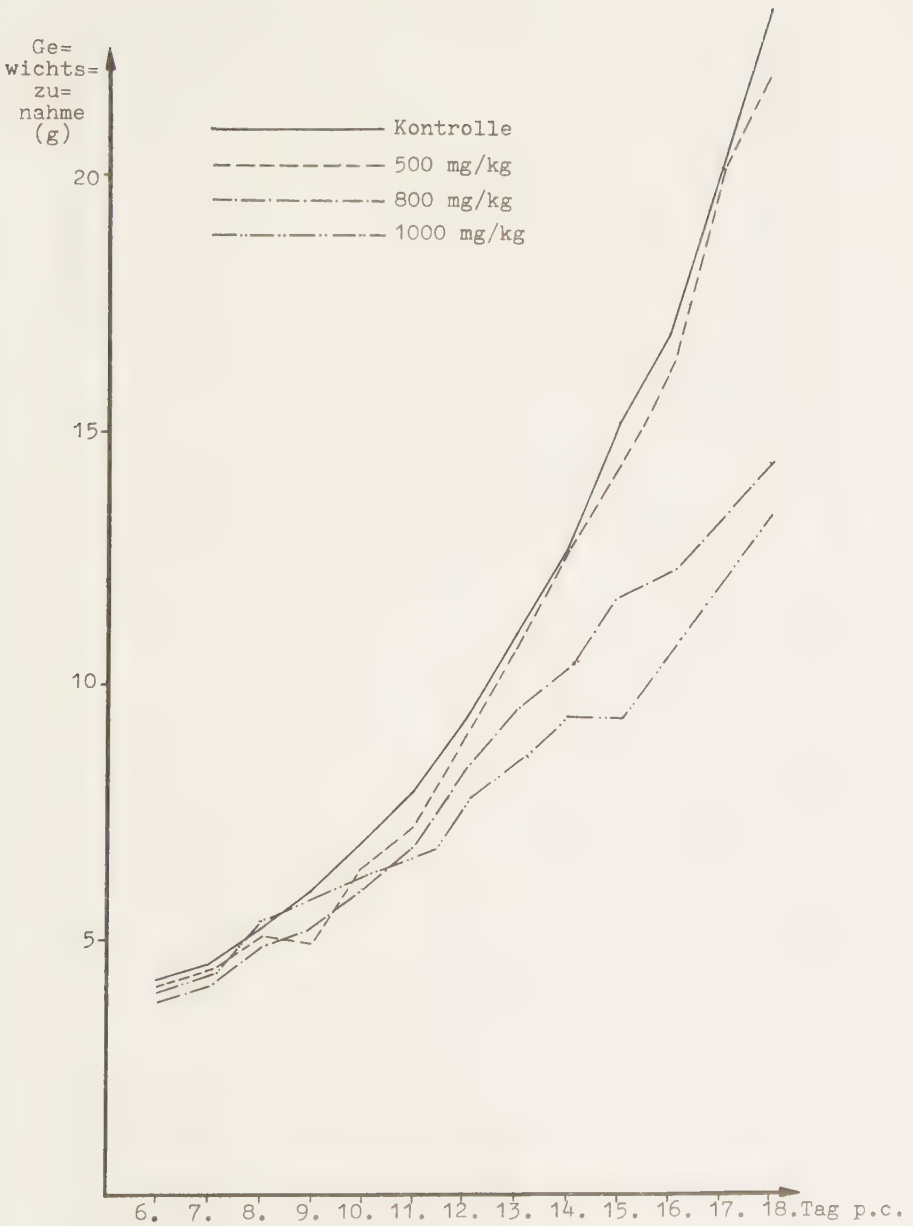


Abb. 1: Gewichtszunahme (g) gravider NMRI-Mäuseweibchen nach oraler Gabe von 0, 500, 800 oder 1000 mg Monolinuron/kg Körpergewicht vom 6.-15. Tag p.c.

Dosis mg/kg	Zeit der Gabe (h)	Leb. Feten (n)	Präimpl. Verlust (n)	Frühe Resorpt. (n)	Späte Resorpt. (n)	Tote Feten (n)	Ausgetrag., lebende Feten (n)	Sek- tions- gewicht (g)	Post- impl. Verl. ()			
0	60	406	155	67	7	0,2	10	1,3	677	80,0	1,17	11,0
20	30	327	25	26	~	1,2	5	1,4	310	83,0	1,17	12,1
50	5	413	23	48	3	2,6	4	0,7	403	87,2	1,14	12,2
100	20	349	60	11	~	3,1	6	2,1	298	86,3	1,13	10,7
200	29	342	70	23	1	2,8	1	0,3	276	83,5	1,08	11,2
300	33	441	44	26	32	7,7	5	1,2	344	84,9	1,08	15,1
400	48	622	24	37	2	3,7	12	2,4	402	87,0	1,04	13,0
500	34	470	51	45	12	2,8	7	1,6	341	82,9	1,01	15,0
800	28	360	56	69	21	5,2	19	0,1	203	65,1	0,80	34,9
1000	28	386	76	88	9	2,9	7	2,3	206	66,5	0,74	33,5

Tabelle 4a: Sektionsbefunde bei graviden NMRI-Mäuseweibchen nach oraler Gabe von 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 800 und 1000 mg Monolinuron/kg vom 1. - 15. Tag der Trächtigkeitszeit

Dosis mg/kg	Ausgetr., lebende Feten (n)	Gaumen= spalten (n) (%)	Exen= cephalien (n) (%)	Ex= enterien (n) (%)	Mikro= gnathien (n) (%)	Rippen gewellt o. verwachsen (n) (%)	Skoliose (n) (%)	Oberkiefer hypo= plastisch (n) (%)
0	677	7 1,0	3 0,4	- -	- -	- -	- -	- -
25	310	6 1,9	2 0,6	2 0,6	1 0,2	2 0,6	- -	- -
50	493	16 3,2	4 0,8	1 0,2	- -	2 0,4	- -	- -
100	258	10 3,9	- -	- -	- -	- -	1 0,4	- -
200	276	11 4,0	- -	- -	- -	- -	2 0,7	3 1,1
300	354	18 5,1	- -	- -	1 0,3	3 0,8	- -	2 0,6
400	468	42 9,0	2 0,4	1 0,2	1 0,2	19 4,1	- -	- -
500	361	41 11,4	- -	2 0,6	2 0,6	- -	1 0,3	- -
800	203	54 26,6	1 0,5	3 1,5	1 0,5	5 2,5	3 1,5	9 4,5
1000	206	73 35,4	- -	- -	2 1,0	1 0,5	- -	24 11,7

Tabelle 4b : Fetale Mißbildungen nach oraler Gabe von 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 800 und

1000 mg Monolinuron/kg an gravide NMRI-Mäuseweibchen vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit

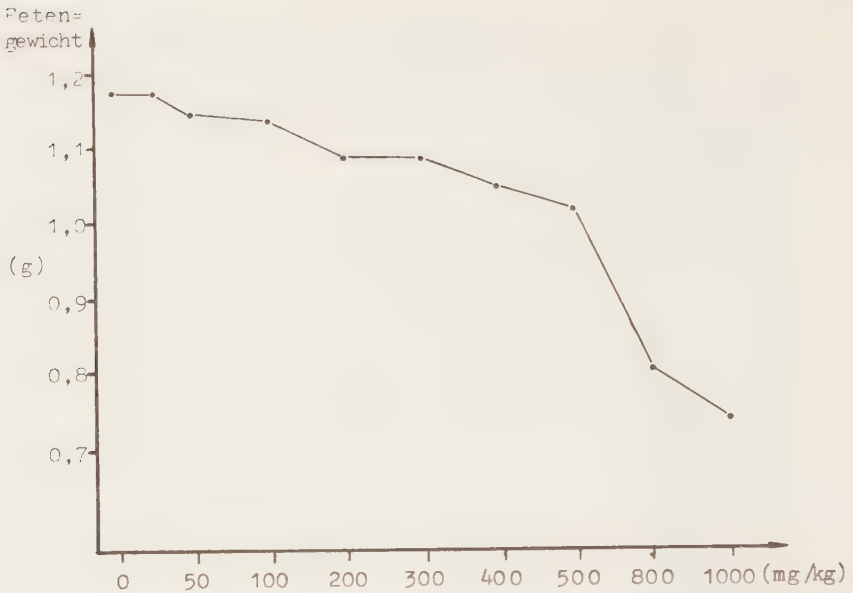


Abb. 2 : Gewicht der Feten am Sektionstag nach oraler Gabe von Monolinuron an die Muttertiere vom 6. - 15. Tag p.c.

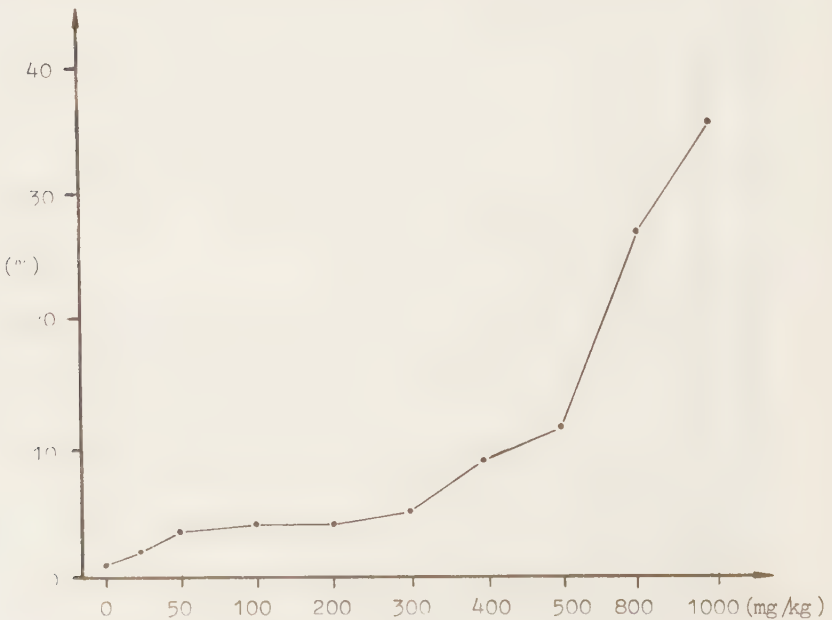


Abb. 3 : Zunahme der Anzahl der Gaumenspalten bei den Feten in Abhängigkeit von der applizierten Monolinuron-Dosis

Applikat. zeit	Zahl der ♀♀ (n)	Corp. lutea (n)	Im= plant. (n)	Präimpl. Verlust (n) (%)	Frühe Resorpt. (n) (%)	Späte Resorpt. (n) (%)	Tote Feten (n) (%)	Ausgetrag., lebende Feten (n) (%)	Sek= tions= gewicht (g)	Post= impl. Verl. (%)
Tag p.c.										
10.+11.	21	250	212	38 15,2	17 8,0	2 0,9	4 1,9	189 89,2	1,13	10,8
12.+13.	42	558	502	56 10,1	47 9,4	8 1,6	4 0,8	443 88,2	1,07	11,8
10.-13.	24	318	269	49 15,4	38 14,1	2 0,7	2 0,7	227 84,4	1,12	15,5

Applikat. zeit	Ausgetrag., lebende Feten (n)	Gaumen= spalten (n) (%)	Exen= cephalien (n) (%)	Ex= enterien (n) (%)	Mikro= gnathien (n) (%)	Rippen gewellt o. verwachsen (n) (%)	Skoliosen (n) (%)	Oberkiefer hypo= plastisch (n) (%)
Tag p.c.								
10.+11.	189	5 2,6	3 1,6	4 2,1	-	1 0,5	-	-
12.+13.	443	18 4,1	3 0,7	5 1,1	-	-	-	-
10.-13.	227	7 3,1	-	-	-	-	-	-

Tabelle 4c : Sektionsbefunde bei graviden NMRI-Mäuseweibchen (oben) und fetale Mißbildungen nach oraler

Gabe von 500 mg Monolinuron zu verschiedenen Stadien der Fetogenese



Abb. 4 : Gaumenspalte nach der oralen Gabe von 800 mg Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag p.c.



Abb. 5 : Exenterie mit Herzektomie nach der oralen Gabe von 800 mg Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag p.c.



Abb. 6 : Normaler Fetus (rechts) und Fetus mit Exencephalie nach oraler Gabe von 50 mg Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag p.c.

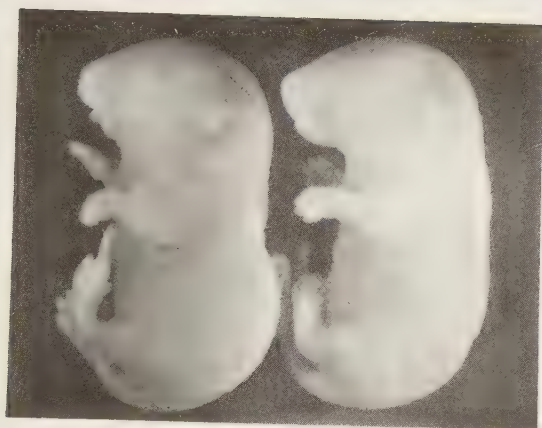


Abb. 7 : Normaltier (rechts) und Fetus mit
Mikrognathie nach oraler Gabe von 1000 mg
Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag p.c.



Abb. 8 : Normaltier nach der
DAWSON-Skelettfärbung.



Abb. 9 : Gewellte und verwach=
Rippen nach 400 mg Monolinuron



Abb. 10 : Skoliose und Mikrognathie nach oraler Gabe von 800 mg Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag p.c.



Abb. 11 : Hypoplastischer Oberkiefer nach oraler Gabe von 1000 mg Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

B. Buturon

Die Kontrolltiere erhielten 0,5 ml Arachisöl und die Versuchstiere 100, 200, 300, 350, 375 oder 400 mg Buturon/kg oral in einer Öl-Substanz-Suspension vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

Die Applikation der Substanz wurde bis zu einer Dosierung von 350 mg/kg gut vertragen. Danach erhöhte sich die Mortalität der Muttertiere auf etwa 20 % nach 375 mg/kg und auf etwa 50 % nach Gabe von 400 mg/kg.

Die Gewichtszunahmen der Muttertiere während der Gravidität sind in Tabelle 5 zusammengefaßt und in Abb. 12 graphisch dargestellt. Bei allen Konzentrationen konnte keine wesentliche Beeinflussung der maternalen Gewichtsentwicklung beobachtet werden. Nur nach Applikation von 400 mg Buturon/kg blieb die tägliche Gewichtszunahme vom 15. Tag p.c. ab hinter der der Kontrolltiere zurück, so daß das durchschnittliche Endgewicht am 18. Tag der Trächtigkeit etwa 5 g unter dem der Kontrollweibchen lag ($P = 0,002$).

Die Sektionsbefunde sind in Tabelle 6a und 6b zusammengestellt. Die präimplantativen Verluste wichen nicht signifikant vom Kontrollwert ab und lagen im physiologischen Schwankungsbereich. Der postimplantative Verlust wurde durch 100 mg/kg bis 350 mg/kg nicht erhöht. Die Applikation von 375 mg/kg und 400 mg/kg ließ ihn jedoch auf 20,8 % bzw. 27,7 % signifikant ansteigen, wobei das Gewicht ganz auf Seiten der frühen Resorptionsstadien lag (17,4 % bzw. 24,2 %). Damit erniedrigte sich die Anzahl der ausgetragenen, lebenden Feten auf 79,2 % bzw. 72,3 %. Die Häufigkeit später Resorptionen und toter Feten wich nicht von der Kontrolle ab. Das Sektions-

gewicht der Feten in der Kontrollgruppe betrug am 18. Tag der Trächtigkeit durchschnittlich 1,20 g ($\pm$ 0,07 g). Die Applikation von 100 mg bzw. 200 mg Buturon/kg/Tag beeinflusste diese Gewichte nicht signifikant. Jedoch war bereits eine fallende Tendenz zu erkennen, die ab 300 mg/kg signifikant erniedrigte Werte erreichte ($P = 0,0002$). Linear dosisabhängig sank das durchschnittliche Fetengewicht auf 0,97 g ($\pm$ 0,04 g) bei Gabe von 400 mg/kg (Abb. 13). Die per section entbundenen Feten wurden sofort auf Gaumenspalten und sonstige äußerlich sichtbare Mißbildungen untersucht. Nach der Aufarbeitung erfolgte eine weitere Inspektion auf Skelettmißbildungen (Tabelle 6b). Neben den Gaumenspalten wurden Exencephalien, Exenterien, Mikrognathien, gewellte oder verwachsene Rippen und Skoliosen gefunden (Abb. 15 - 21). Die spontane Rate für Gaumenspalten betrug bei den Kontrolltieren 1,2 %. 100 mg und 200 mg Buturon beeinflussten diese Mißbildungsrate nicht. Die Gabe von 300 mg/kg erhöhte die Anzahl der Gaumenspalten signifikant auf 5,6 % ($P = 0,005$). Alle höheren Substanzkonzentrationen führten dosisabhängig zu einem Anstieg der Häufigkeit der Gaumenspalten. Nach Applikation von 400 mg/kg hatten 15,1 % der Feten diese Mißbildung (Abb. 14). Exencephalien, Exenterien, Mikrognathien, gewellte oder verwachsene Rippen und Skoliosen wurden nur vereinzelt gefunden. Bis zu einer Dosierung von 375 mg/kg konnte keine signifikante Erhöhung dieser Anomalien beobachtet werden. Nach der Gabe von 400 mg/kg konnte dagegen eine Zunahme von verwachsenen Rippen auf 3,5 % und der Exenterien auf 4,5 % gegenüber jeweils 0,3 % bei den Kontrolltieren statistisch gesichert werden ($P < 0,002$). Die Inzidenzspezifität von Buturon auf die fetale Entwicklung

wurde durch orale Applikation der Substanz am 10. und 11. Tag, 12. und 13. Tag sowie vom 10. bis 13. Tag der Trächtigkeit überprüft. Die drei Versuchsgruppen erhielten jeweils 350 mg Buturon/kg/Tag.

Die Sektionsbefunde sind in Tabelle 6c zusammengefaßt. Die präimplantativen Stadien wurden durch die späte Substanzgabe nicht mehr beeinflusst, so daß die präimplantativen Verluste im Kontrollbereich lagen. Der postimplantative Verlust - Resorptionen und tote Feten - blieb unverändert, wenn die Substanz am 10. und 11. Tag gegeben wurde. Wurde Buturon am 12. und 13. Tag der Trächtigkeit verabreicht, erhöhte sich der postimplantative Verlust auf 27,0 %. Wurde vom 10. - 13. Tag p.c. injiziert, betrug der postimplantative Verlust 17,6 % ($P < 10^{-5}$), wobei das Gewicht bei beiden Versuchen auf Seiten der frühen Resorptionsstadien lag (24,3 % bzw. 12,7 %). Das Sektionsgewicht wurde ebenfalls bei beiden Versuchen durch die Substanz signifikant auf durchschnittlich 1,08 g ($\pm 0,04$ g) gegenüber 1,20 ($\pm 0,07$ g) bei den Kontrolltieren gesenkt ($P = 0,0002$). Mißbildungen traten nur in Form von Gaumenspalten auf. Während die Applikation am 10. und 11. Tag p.c. nicht zu einer signifikanten Erhöhung führte, konnte nach Gabe der Substanz am 12. und 13. Tag bzw. vom 10. - 13. Tag der Gravidität eine signifikante Zunahme dieser Mißbildungen auf 13,3 % bzw. 11,0 % der Feten gegenüber 1,2 % bei den Kontrolltieren beobachtet werden. Die Mißbildungsrate lag damit nach zwei- bzw. viermaliger Applikation etwa ebenso hoch wie nach zehnmaliger Gabe der Substanz vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

Dosis mg/kg	Tag der Trächtigkeit													
	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	
0	2,3	3,6	4,0	5,4	5,9	6,6	7,8	9,6	11,3	13,3	17,3	19,3	23,6	
100	3,1	3,6	4,5	5,1		7,1	9,0	11,2	13,1	15,2	17,6		23,4	
200	3,0	3,3	4,6		5,9	7,5	9,2	11,0	12,8	14,4		18,6	21,7	
300	3,4	4,8	5,1	5,4	6,6	7,5	9,3	11,5	14,0	16,7	18,4	19,8	21,3	
350	3,0	3,2	4,2	4,8	5,8	5,8	7,0	8,9	11,0	13,1	14,3	16,7	20,1	
375	3,2	4,5	4,9		5,7	6,5	8,0	9,9	11,6	13,3		17,5	21,1	
400	3,2	5,1	4,5	4,5		6,3	7,4	9,0	11,6	12,6	14,6		18,0	

Tabelle 5 : Gewichtszunahme (in g) gravider NMRI-Mäuseweibchen nach oraler Gabe von 0, 100, 200, 300, 350, 375 und 400 mg Buturon/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

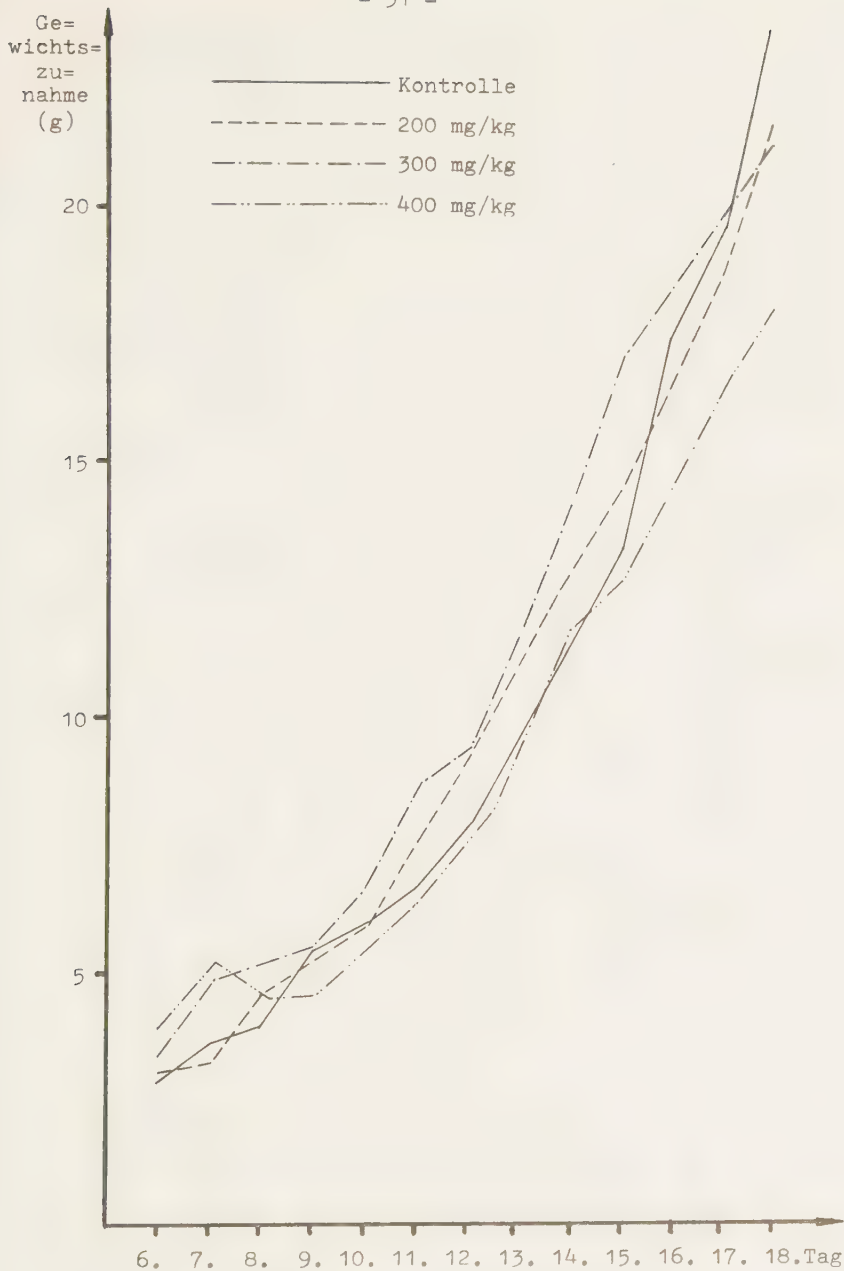


Abb. 12 : Gewichtszunahme (g) gravider NMRI-Mäuseweibchen
nach oraler Gabe von 0, 200, 300 oder 400 mg Buturon/kg
vom 6. - 15. Tag p.c.

Gravidität	Anteil der Totgeborenen (%)	Anteil der Lebgeborenen (%)	Primärer Verlust (%)	Früher Resorpt. (%)	Später Resorpt. (%)	Tote Feten (n)	Ausgetragen lebende Feten (n)	Sektionsgewichte (g)	Postimplant. Verl. (%)					
300	42	528	70	13,3	34	7,4	10	2,2	5	1,1	409	89,3	1,0	10,7
350	31	403	48	11,9	24	6,8	2	0,6	2	0,6	327	92,1	1,18	7,9
400	42	400	38	9,3	41	11,0	9	2,4	7	1,4	315	84,7	1,15	15,3
300	36	425	60	12,6	31	7,5	19	4,6	6	1,4	359	86,5	1,11	13,5
340	31	367	30	9,2	21	6,2	10	3,0	5	1,5	301	89,3	1,03	10,7
375	27	363	46	12,7	55	17,4	8	2,5	3	0,9	251	79,2	1,01	20,8
400	31	280	24	8,6	62	24,2	6	2,3	3	1,2	185	72,3	0,97	27,7

Tabelle 6a : Sektionsbefunde bei graviden NMRI-Mäuseweibchen nach oraler Gabe von 0, 100, 200, 300, 350, 375 und 400 mg Buturon/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

Dosis mg/kg	Ausgetrag., lebende Feten (n)	Gaumen= spalten (n) (%)	Exen= cephalien (n) (%)	Ex= enterien (n) (%)	Mikro= gnathien (n) (%)	Rippen gewellt o. verwachsen (n) (%)	Skoliosen (n) (%)
0	409	5 1,2	2 0,5	1 0,3	- -	1 0,3	1 0,3
100	327	5 1,5	- -	5 1,5	2 0,6	- -	- -
200	315	5 1,6	2 0,6	2 0,6	1 0,3	- -	- -
300	359	20 5,6	- -	4 1,1	1 0,3	- -	- -
350	301	33 11,0	- -	1 0,3	1 0,3	9 3,0	- -
375	251	35 13,9	- -	3 1,2	1 0,4	- -	- -
400	185	28 15,1	5 2,7	8 4,3	1 0,5	7 3,5	- -

Tabelle 6b : Fetale Mißbildungen nach oraler Gabe von 0, 100, 200, 300, 350, 375 und

400 mg Buturon/kg an gravide NMRI-Mäuseweibchen

vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

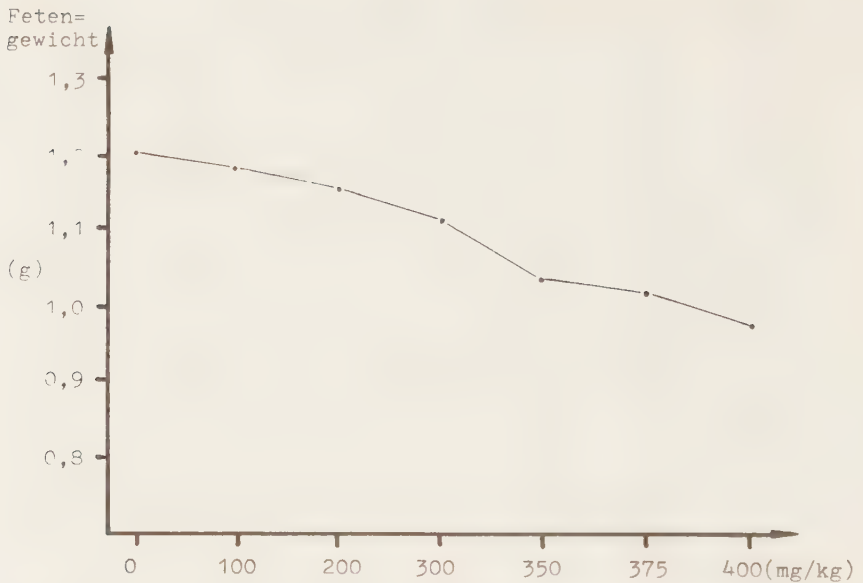


Abb. 13 : Gewicht der Feten am Sektionstag nach oraler Gabe von Buturon an die Muttertiere vom 6. - 15. Tag p.c.

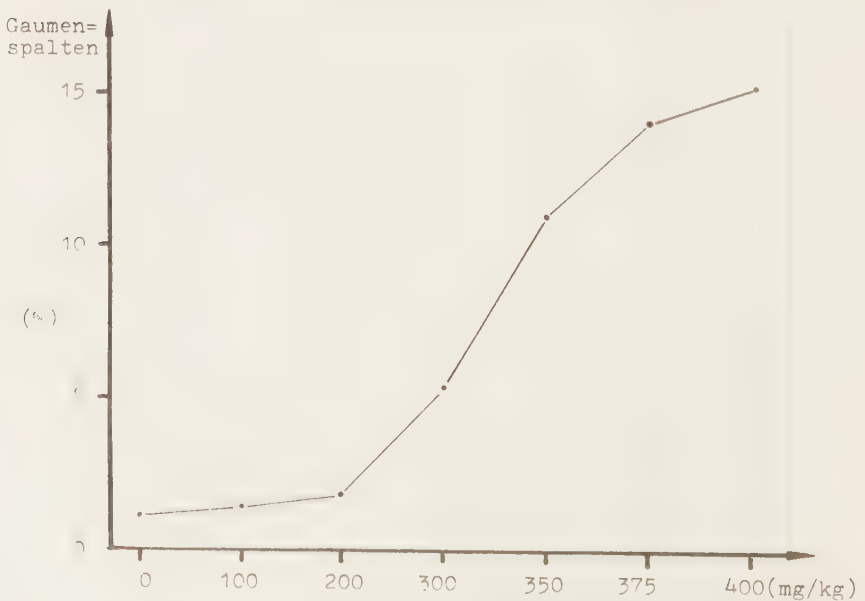


Abb. 14 : Zunahme der Anzahl der Gaumenspalten bei den Feten in Abhängigkeit von der applizierten Buturon-Dosis

Applikat. zeit	Zahl der ♀ (n)	Corp. lutea (n)	Im= plant. (n)	Präimpl. Verlust (n)	Frühe Resorpt. (n)	Späte Resorpt. (n)	Tote Feten (n)	Ausgetrag., lebende Feten (n)	Sek= tions= gew. (g)	Post= impl. Verl. (%)
Tag p.c.										
10.+11.	12	165	147	18 10,9	14 9,5	3 2,0	2 1,4	128 87,1	1,08	12,9
12.+13.	27	357	300	57 16,0	73 24,3	6 2,0	2 0,7	219 73,0	1,08	27,0
10.-13.	19	259	221	38 14,7	28 12,7	7 3,2	4 1,8	182 82,4	1,14	17,6

Applikat. zeit	Ausgetrag., lebende Feten (n)	Gaumen= spalten (n)	Exen= cephalien (n)	Ex= Enterien (n)	Mikro= gnathien (n)	Rippen gewellt o. verwachsen (n)	Skoliosen (n)
Tag p.c.							
10.+11.	128	3 2,4	-	-	-	-	-
12.+13.	219	29 13,3	-	-	-	-	-
10.-13.	182	20 11,0	-	-	-	-	-

Tabelle 50: Sektionsbefunde bei graviden NMRI-Mäuseweibchen (oben) und fetale Mißbildungen nach oraler Gabe von 350 mg Buturon/kg zu verschiedenen Stadien der Fetogenese.

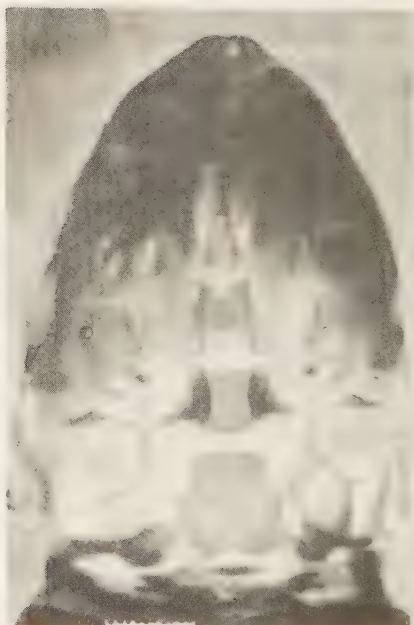


Abb. 15 : Darstellung des knöchernen Gaumens nach DAWSON bei einem Tier der Kontrollgruppe.



Abb. 16 : Gaumenspalte nach oraler Gabe von 400 mg Buturon/kg vom 6.-15.Tag p.c.



Abb. 17 : Feten mit Exencephalien nach oraler Gabe von 400 mg Buturon/kg vom 6. - 15. Tag p.c.



Abb. 18 : Exenterie (Herzektopie)
nach oraler Gabe von 400 mg Butu=
ron/kg vom 6. - 15. Tag p.c.



Abb. 19 : Normaltier (rechts) und Fetus mit
Mikrognathie nach oraler Gabe von 400 mg Bu=
turon/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.



Abb. 20 : Verwachsene Rippen ("Gabelrippen") nach oraler Gabe von 400 mg Buturon/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

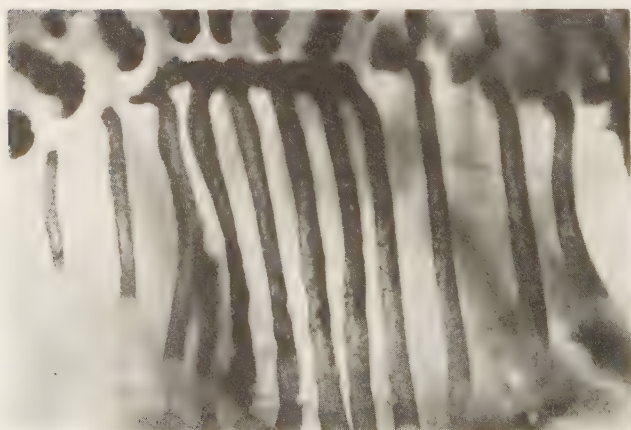


Abb. 21 : Verwachsene Rippen nach oraler Applikation von 400 mg Buturon/kg vom 6. - 15. Tag.

3. Aufzuchtversuche

A. Monolinuron

Zur Ergänzung der Untersuchungen der Teratogenität wurde ein Aufzuchtversuch durchgeführt, der eine Beurteilung der Postnatalentwicklung erlaubte.

Die Muttertiere der Kontrollgruppe erhielten 0,5 ml Oleum Arachidis und die Versuchstiere 200 mg bzw. 500 mg Monolinuron/kg als ölige Suspension oral vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit. Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 7a und 7b zusammengefaßt und in Abb. 22 graphisch dargestellt. Die 48 Kontrollweibchen warfen durchschnittlich 10,0 Jungtiere. Von 595 Implantaten entwickelten sich 481 zu ausgewachsenen Feten, der postimplantative Verlust betrug 19,2 %. Die Würfe enthielten durchschnittlich 1,2 % Totgeburten und 6,2 % der Jungtiere starben innerhalb der Laktationsperiode (3 Wochen). Damit betrug die Gesamtmortalität im Kontrollversuch 7,5 %. 2,1 % aller ausgetragenen und geworfenen Jungtiere hatten Gaumenspalten. Nach der Geburt wogen die Tiere durchschnittlich 1,56 g und nach 3 Wochen 9,75 g.

Die Applikation von 200 mg Monolinuron/kg beeinflusste keinen der untersuchten Parameter. Weder in der pränatalen noch in der postnatalen Entwicklungsphase konnten Unterschiede zum Kontrollversuch festgestellt werden. Die Zahl der Gaumenspalten war nicht erhöht.

Dagegen führte die Gabe von 500 mg/kg zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtmortalität auf 28,9 % gegenüber dem Kontrollwert von 7,5 %. 7,1 % der Feten wurden bereits tot geboren und innerhalb der Laktationsperiode starben noch 21,7 % der geworfenen Tiere. Während das Geburtsgewicht aller Jungtiere gegenüber den Kontrolltieren auf 1,39 g signifikant erniedrigt war ($P < 0,0027$), holten die überlebenden Tiere dieses Defizit bis zur dritten Lebenswoche wieder auf. 9,9 % der geworfenen Jungtiere hatten Gaumenspalten. Dieser Wert lag signifikant über dem Kontrollniveau ($P < 0,0027$).

B. Buturon

Die Muttertiere erhielten eine tägliche orale Dosis von 200 mg bzw. 350 mg Buturon/kg in einer entsprechenden Arachisöl - Suspension vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit. Die in den Tabellen 8a und 8b zusammengefaßten Versuchsergebnisse wurden auf den gemeinsamen Kontrollversuch bezogen, der beim Aufzuchtversuch mit Monolinuron beschrieben wurde. Die Gewichtszunahme der Muttertiere während der Gravidität ist in Abb. 23 dargestellt. Die Applikation von 200 mg Buturon/kg beeinflusste die Wurfgröße, d.h. die durchschnittliche Zahl der Nachkommen pro Weibchen nicht. Für die Höhe des postimplantativen Ver-

lustes und die Anzahl der Totgeburten ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied gegenüber dem Kontrollversuch. In den ersten drei Lebenswochen (Laktationsperiode) starben jedoch 16,7 % der Jungtiere, so daß sich die Gesamtmortalität nach Gabe von 200 mg Buturon/kg/Tag auf 20,1 % gegenüber 7,5 % im Kontrollversuch erhöhte ($P = 0,002$). Die Zahl der Gaumenspalten wich mit 4,7 % nicht signifikant von der Kontrolle ab ($P = 0,05$), und sowohl das durchschnittliche Geburts- als auch das Absetzgewicht nach der 3. Lebenswoche lagen im physiologischen Schwankungsbereich.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach Gabe von 350 mg Buturon/kg beobachtet. Die Zahl der Feten⁹ und der postimplantative Verlust unterschieden sich nicht wesentlich vom Kontrollversuch. Während auch die Zahl totgeborener Jungtiere annähernd gleich blieb, erhöhte sich die Anzahl der in der Laktationsperiode verstorbenen Jungtiere signifikant auf 15,6 %, so daß die Gesamtmortalität auf 18,0 % anstieg ($P < 0,0001$). Die Geburts- und Absetzgewichte wurden durch die Substanzgabe nicht beeinflusst, jedoch ließ sich die Zunahme der Zahl der Gaumenspalten auf 9,0 % gegenüber 2,1 % im Kontrollversuch statistisch sichern ($P < 0,0001$).

Dosis mg/kg	Tag der Trächtigkeit													
	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
0	4,3	4,4	5,1	6,2	6,7		9,5	11,2	13,0	15,4	18,4	20,8	24,7	24,9
200	3,1	3,0	3,8	4,8	5,6	6,2	7,9	10,1	12,2	14,4	16,8	18,3	22,4	22,6
500	2,8	2,3	3,6	5,0		6,3	7,9	9,4	10,9	12,4				18,8

Tabelle 7a : Gewichtszunahme (in g) gravider NMRI-Mäuseweibchen im Aufzuchtversuch nach oraler Gabe von 0, 200 und 500 mg Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

Dosis mg/kg	Zahl der ♀ (n)	Im= plane tate (n)	Zahl der Feten (n)	Feten pro ♀ (n)	Post= impl. Verl. (%)	Tot= geburten (n)	Tot= geburten (n)	Verstorb. Jungtiere bis 3. Woche (n)	Gesamt= mortalität (n)	Ge= burts= gew. (g)	Ab= setz= gew. (g)	Gaumen= spalten (n)	Gaumen= spalten (n)
0	48	595	481	10,0	19,2	6	1,2	30	36	1,56	9,75	10	2,1
200	34	403	343	10,1	14,9	7	2,0	23	30	1,51	10,42	9	2,6
500	28	340	253	9,0	25,6	18	7,1	55	73	1,39	11,40	25	9,9

Tabelle 7b : Befunde des Aufzuchtversuchs mit graviden NMRI-Mäuseweibchen nach oraler Gabe von 0, 200 und 500 mg Monolinuron/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

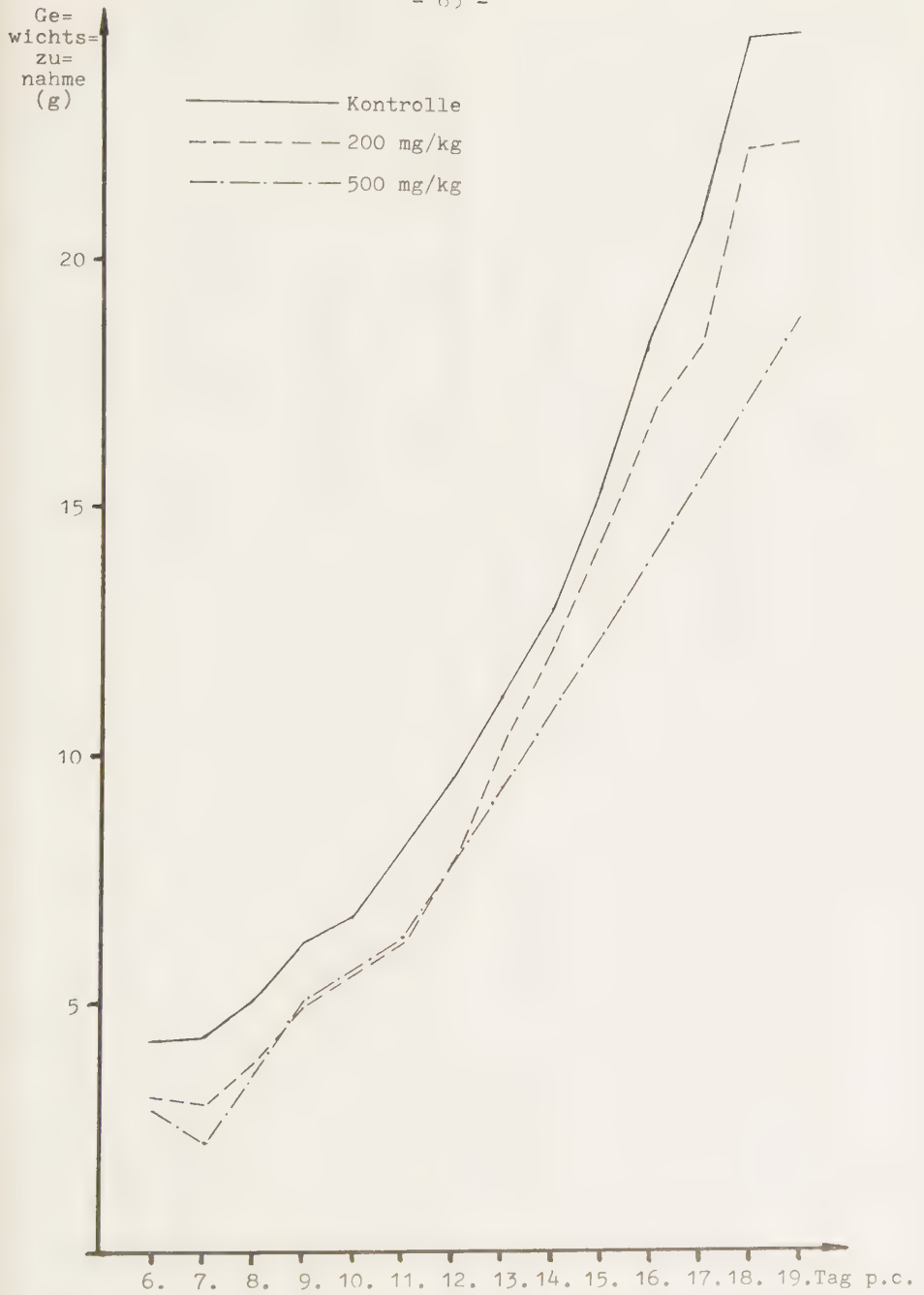


Abb. 22 : Gewichtszunahme (g) gravider NMRI-Mäuseweibchen im Aufsuchtversuch nach Gabe von 0, 200 und 500 mg Monolinuron/kg.

Dosis mg/kg	6.	7.	8.	9.	10.	Tag der Trächtigkeit				16.	17.	18.	19.
						11.	12.	13.	14.				
0	4,3	4,4	5,1	6,2	6,7		9,5	11,2	13,0	15,4	20,8	24,7	24,9
200	4,9	4,1	4,6	5,6	6,8	7,3	9,1	11,0	12,8	14,9		22,6	22,5
350	2,7	3,3	3,9	4,4		6,6	8,7	10,3	12,6	14,9		20,1	24,4

Tabelle 8a : Gewichtszunahme (in g) gravider NMRI-Mäuseweibchen im Aufzuchtversuch nach oraler Gabe von 0, 200 und 350 mg Buturon/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit

Dosis mg/kg	Zahl der ♀ (n)	Im= plan= tate (n)	Zahl der Feten (n)	Feten pro ♀ (n)	Post= impl. Verl. (%)	Tot= Geburten (n)	Verstorb. Jungtiere bis 3. Woche (n)	Gesamt= mortalität (n)	Ge= burts= gew. (g)	Ab= setz= gew. (g)	Gaumen= spalten (n)	(%)
0	48	595	481	10,0	19,2	6	30	36	1,56	9,75	10	2,1
200	26	309	234	9,0	24,3	8	39	47	1,62	11,16	11	4,7
350	24	310	244	10,2	21,3	6	38	44	1,58	10,30	22	9,0

Tabelle 8b : Befunde des Aufzuchtversuchs mit graviden NMRI-Mäuseweibchen nach oraler Gabe von 0, 200 und 350 mg Buturon/kg vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.



Abb. 23 : Gewichtszunahme (g) gravider NMRI-Mäuseweibchen im Aufzuchtversuch nach Gabe von 0, 200 und 350 mg Buturon/kg

4. Untersuchung zur Mutagenität

a. Test auf dominante Letalfaktoren

A. Monolinuron

Fünfzehn NMRI-Männchen der Kontrollgruppe erhielten 5 Tage lang täglich je 0,5 ml Arachisöl ; zwei weitere Gruppen von jeweils 20 männlichen Tieren erhielten 250 mg/kg bzw. 1000 mg Monolinuron/kg in einer öligen Suspension oral per Schlundsonde verabreicht. Jedes Männchen wurde nach zwei Tagen 7 Wochen lang mit 3 Weibchen pro Woche verpaart. Die Sektion der begatteten Weibchen erfolgte zwischen dem 13. und 15. Tag der Trächtigkeit. Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 9 a - d zusammengefaßt und in den Abb. 24 und 25 graphisch dargestellt.

Die Fertilitätsprüfung (Tabelle 9 a , Abb. 24) wurde mit der Bestimmung der Befruchtungsquote (Zahl der Weibchen mit Implantationsstellen / Zahl der verpaarten Weibchen) durchgeführt. Bei den Kontrolltieren schwankte die Rate befruchteter Weibchen zwischen 68,9 % und 84,4 % und betrug durchschnittlich 77,5 %. Die Applikation von 250 mg Monolinuron/kg führte zu einer Senkung der Befruchtungsquote über den gesamten Spermiogenesezyklus der Männchen. Die Unterschiede der ersten beiden Verpaarungswochen (68,3 % und 63,3 %) im Vergleich zum Kontrollversuch (77,5 %) waren zwar statistisch noch nicht zu sichern ($P = 0,05$ und $P = 0,02$), jedoch war die fallende Tendenz bereits deutlich zu erkennen. Die Werte sanken auf 60,0 % in der dritten und auf 58,3 % bzw. 56,7 % in der 4. bzw. 5. Verpaarungswoche. In der 6. Woche wurde eine leichte

Erhöhung (60,0 %) und in der 7. Verpaarungswoche die niedrigste Befruchtungsquote (41,7 %) beobachtet.

Ein ähnliches Bild ergab die Fertilitätsprüfung nach der Gabe von 1000 mg Monolinuron/kg. Schon in der ersten Verpaarungswoche war die Befruchtungsquote mit 55,0 % gegenüber den Kontrollwerten signifikant erniedrigt ($P < 0,0005$). Nach einem noch stärkeren Absinken auf 41,7 % in der 2. Woche trat auch hier wieder eine Erholungsphase ein, die in diesem Versuch in der 6. Verpaarungswoche sogar einen Wert erreichte (66,7 %), dessen Unterschied zum Kontrollversuch sich statistisch nicht mehr sichern ließ ($P = 0,08$). In der 7. Woche der Spermiogenese wurde ein erneuter Abfall der Fertilität auf 51,7 % beobachtet ($P < 0,0001$). Die orale Gabe von Monolinuron an männliche NMRI-Mäuse schädigte also fast alle Stadien der Spermiogenese. Während nach 250 mg/kg erst die frühen Spermatiden (3. Woche) und die Spermatocyten (4. Woche) geschädigt wurden, wurden nach Applikation von 1000 mg/kg sowohl die Spermien im Vas deferens und der Epididymis (1. Woche) als auch die späten und mittleren Spermatiden (2. Woche) in ihrer Fertilität beeinträchtigt. Die späten Spermatogonien waren relativ unempfindlich gegen die Substanz, so daß in der 6. Verpaarungswoche bei beiden Versuchsgruppen eine Erholung der Fertilität eintrat. Die frühen Spermatogonien (7. Woche) erwiesen sich allerdings wieder als sehr empfindlich, denn die Befruchtungsquote sank auf sehr niedrige Werte gegenüber den Kontrolltieren ab (41,7 % bzw. 51,7 % gegenüber 77,5 %). Durch die Sektion der trächtigen Weibchen am 13. - 15. Tag der Gravidität wurde die Anzahl der Corpora lutea, der Implantationsstellen sowie die Anzahl der Resorptionen

und der toten Feten festgestellt (Abb. 26 - 31). Daraus wurden die prä- und postimplantativen Verluste errechnet (Tabelle 9b und 9c). Der präimplantative Verlust, d.h. die Anzahl der vor der Nidation zugrundegegangenen Blastocysten, schwankte im Kontrollversuch zwischen 5,4 % und 16,3 % und betrug durchschnittlich 12,2 % (Tabelle 9b). Nach der Applikation von 250 mg Monolinuron/kg konnte in der 1. Verpaarungswoche ein signifikanter Anstieg des präimplantativen Verlustes auf 21,1 % beobachtet werden ($P < 10^{-8}$). In den folgenden Verpaarungswochen wich die Zahl abgestorbener Blastocysten nicht signifikant vom Kontrollwert ab. Die Gabe von 1000 mg Monolinuron/kg an die männlichen Tiere erhöhte den präimplantativen Verlust in der ersten Verpaarungswoche auf 17,3 % ($P < 0,0027$). Bis zur 3. Woche stieg er auf 22,1 % ($P = 10^{-7}$), in der 4. Verpaarungswoche fiel er wieder auf 17,7 % ($P < 0,001$). Die restliche Zeit der Spermiogenese blieb unbeeinflusst durch die Substanz.

Der postimplantative Verlust, d.h. die Zahl der resorbierten Früchte und toten Feten, schwankte bei den Kontrolltieren zwischen 5,8 % und 11,8 % und betrug im Durchschnitt 8,7 % (Tabelle 9c). Hauptsächlich wurden frühe Resorptionen gefunden, späte Resorptionen und tote Feten traten nur vereinzelt und zufällig verteilt auf. Die orale Applikation von täglich 250 mg Monolinuron/kg bzw. 1000 mg/kg an die Männchen führte jeweils in der 1. Verpaarungswoche bei den Weibchen zu einer signifikanten Erhöhung des postimplantativen Verlustes auf 13,4 % bzw. 14,2 % ($P < 0,0027$ bzw. $P = 0,0005$). In der Hauptsache gingen die Keime in den frühen Stadien vor der Plazentation zugrunde, jedoch wurden nach

Gabe von 250 mg/kg in den Würfen der ersten Verpaarungs-
woche 7 späte Resorptionen und 7 tote Feten, nach 1000 mg/kg
10 späte Resorptionen und 15 tote Feten gefunden. In den
folgenden sechs Wochen des Spermiogenesezyklus wichen die
Werte der postimplantativen Verluste nicht signifikant von
denen der Kontrolltiere ab.

Aus den prä- und postimplantativen Verlusten ergaben sich
die Gesamtverluste, d.h. die Differenzen zwischen der An-
zahl ovulierter Follikel und der Anzahl der lebenden Feten.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 9c angegeben und in den Abb.
25a-g graphisch dargestellt. Im Kontrollversuch schwankte
der Gesamtverlust zwischen 15,3 % und 25,4 % und betrug
durchschnittlich 21,3 %. Die Gabe von 250 mg Monolinuron/kg
führte zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtverlustes
auf 31,7 % in der 1. Woche des Spermiogenesezyklus ($P < 0,0001$). Im Vergleich mit dem Kontrollversuch errechnete
sich daraus eine Letalität aller Zygoten von 0,131. Auch
die Applikation von 1000 mg Monolinuron/kg an die männ-
lichen Tiere führte zu einem signifikant erhöhten Gesamt-
verlust von 29,0 % aller Zygoten bei den Weibchen in der
ersten Verpaarungswoche ($P = 0,0006$). Daraus ergab sich
eine Letalität der Zygoten von 0,098. Im Gegensatz zu dem
Versuch, in dem die Tiere 250 mg/kg erhalten hatten, wurde
bei 1000 mg/kg auch eine erhöhte Sensibilität der frühen
Spermatiden festgestellt. Bei einem Gesamtverlust von 29,0 %
($P < 0,0027$) wurde eine Letalität aller Zygoten von 0,097
errechnet.

Verpaarungs- woche nach Substanz- gabe	Verpaarte ♀♀			♀♀ mit Implantaten			Befruchtungsquote			
	K	250	1000	K	250	1000	K	250	1000	P
1.	45	60	60	37	41	32	82,2	68,3	55,0	0,0005
2.	45	60	60	35	38	20	77,8	63,3	41,7	$<10^{-7}$
3.	45	60	60	34	36	30	75,6	60,0	50,0	$<10^{-5}$
4.	45	60	60	33	35	34	73,3	58,3	56,7	0,001
5.	45	60	60	38	34	32	84,4	56,7	53,3	0,0001
6.	45	60	60	31	36	40	68,9	60,0	66,7	0,08
7.	45	60	60	36	25	31	80,0	41,7	51,7	0,0001

Tabelle 9a: Fertilitätsprüfung männlicher NMRI-Mäuse nach fünfmaliger oraler Behandlung mit 0, 250 bzw. 1000 mg Monolinuron/kg.

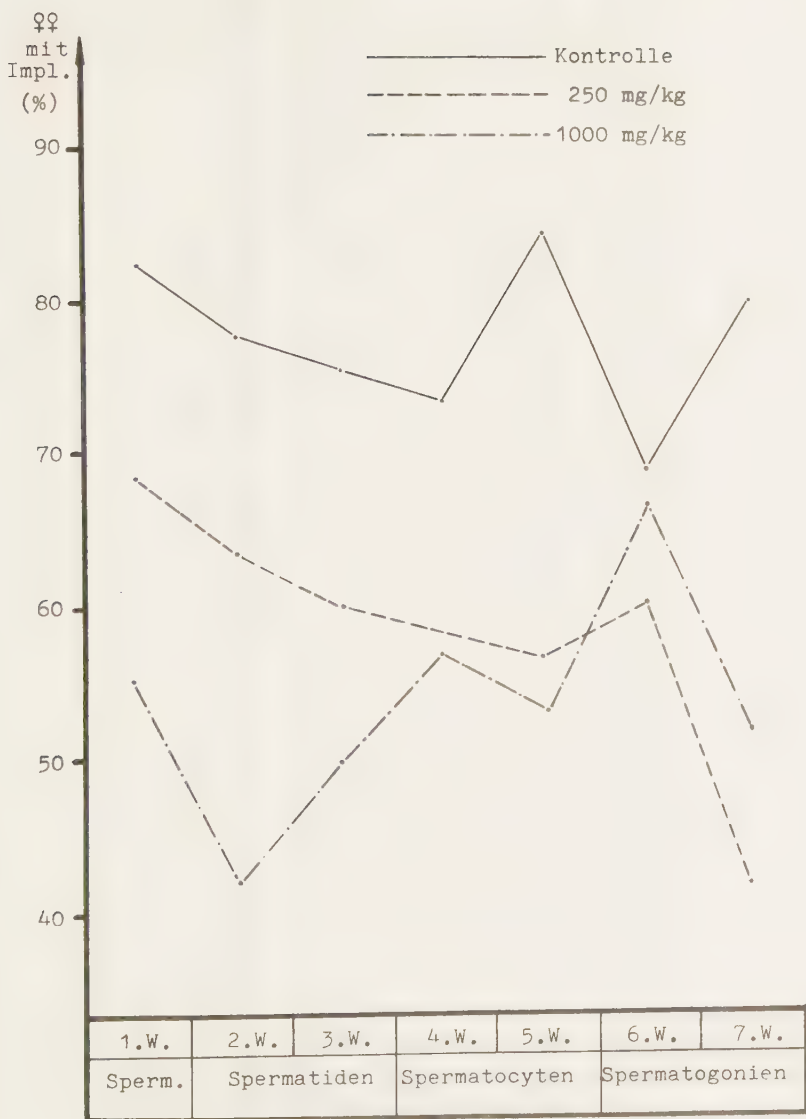


Abb. 24 : Fertilitätsprüfung männlicher NMRI-Mäuse nach fünfmaliger oraler Behandlung mit 0, 250 bzw. 1000 mg Monolinuron/kg.

Ver- paar. woche nach Subst. gabe	♀♀ mit Implantaten			Anzahl der Corpora lutea			Anzahl der Implantate			Präimplantativer Verlust							
	K		1000	K		250	1000	K		250	1000	K			250	1000	
	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(n)	(%)	(n)	(%)	P
1.	37	41	33	455	534	513	389	500	424	66	14,5	134	21,1	10 ⁻⁸	89	17,3	0,0027
2.	35	38	25	427	531	368	399	453	294	38	8,7	78	14,7	0,12	74	20,1	0,001
3.	34	36	30	422	515	403	395	441	314	77	16,3	74	14,4	0,12	89	22,1	< 10 ⁻⁷
4.	33	35	34	457	506	514	385	427	423	73	16,0	79	16,4	0,04	91	17,7	0,001
5.	38	34	32	499	466	461	428	390	394	71	14,2	76	16,3	0,04	67	14,5	0,1
6.	31	36	40	404	507	574	363	444	501	41	10,1	63	12,4	0,1	73	12,7	0,1
7.	36	25	31	482	375	453	456	339	383	26	5,4	36	9,6	0,1	70	15,4	0,1

Tabelle 9b : Präimplantativer Verlust gravider NMRI-Mäuseweibchen nach fünfmaliger Behandlung der männlichen Tiere mit 0, 250 bzw. 1000 mg Monolinuron/kg.

Ver- par. woche nach Subst. gabe	Zahl d. Implantate (n)			Lebende Implantate (n)			Postimplant. Verlust						Gesamtverlust						Letalität	
							(n)		(n)		(n)		(n)		(n)		(n)			
	K	250	1000	K	250	1000	K	250	1000	(%)	(n)	(%)	K	250	1000	(%)	(n)	(%)	250	1000
1.	389	500	424	356	433	364	33	8,5	67	13,4	60	14,2	99	21,8	201	31,7	149	29,0	0,131	0,098
2.	399	453	294	352	401	271	47	11,8	52	11,5	23	7,8	85	19,5	130	24,5	97	26,4	0,040	0,064
3.	395	441	314	361	395	286	34	8,6	46	10,4	28	8,9	111	23,5	120	23,3	117	29,0	0,024	0,097
4.	385	427	423	342	376	376	43	11,2	51	11,9	47	11,1	116	25,4	130	25,7	138	26,8	0,055	0,069
5.	428	390	394	391	373	357	37	8,6	17	5,4	37	9,4	108	21,6	93	20,0	104	22,6	0,018	0,015
6.	363	444	501	324	406	446	21	5,8	38	8,6	55	11,0	62	15,3	101	19,9	128	22,3	0,019	0,012
7.	456	339	383	376	316	352	80	17,5	23	6,8	31	8,1	106	22,0	59	15,7	101	22,3	0,072	0,012

Tabelle 9c : Postimplantativer Verlust und Gesamtverlust gravider NMRI-Mäuseweibchen und Letalität aller Zvgoten nach fünfmaliger Behandlung der männlichen Tiere mit 0, 250 bzw. 1000 mg Monolinuron/kg

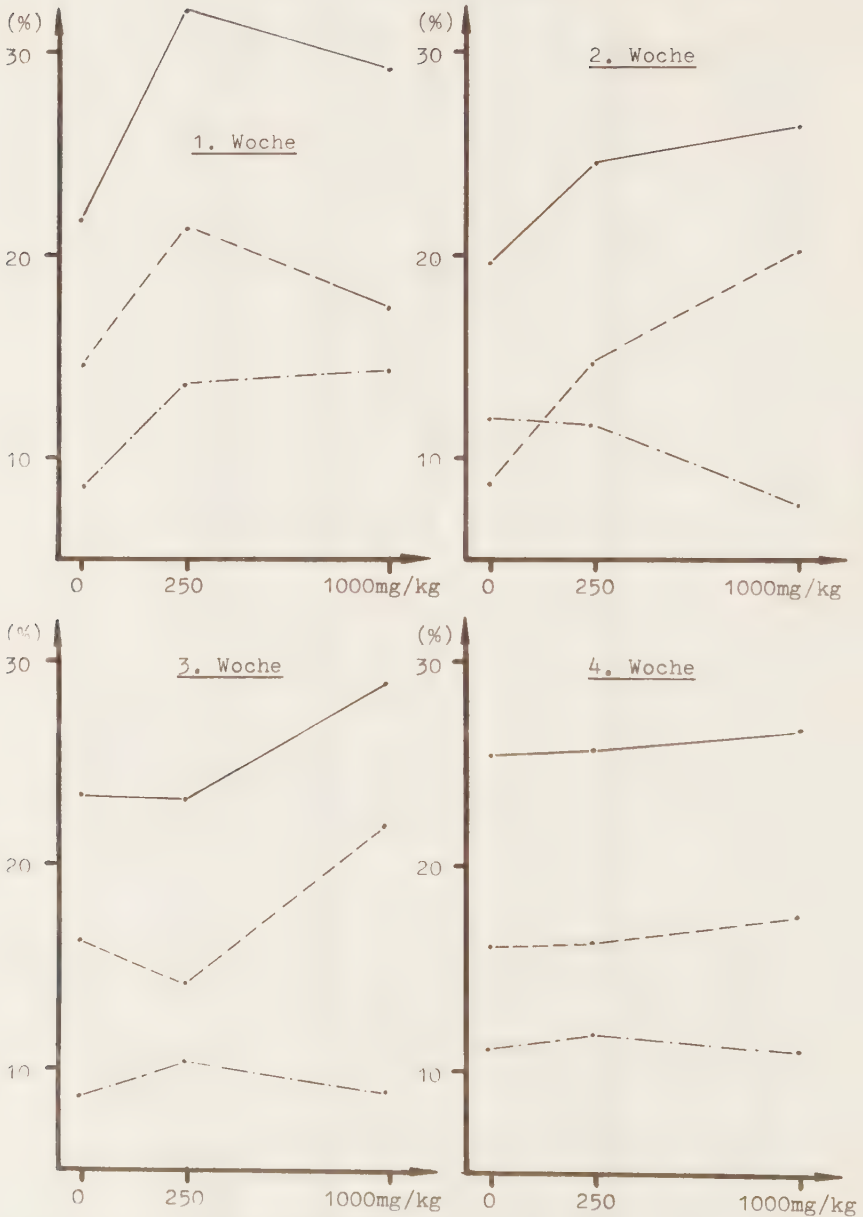


Abb. 25a-d : Präimplantativer (----), postimplantativer (-.-.-) und Gesamtverlust (—) gravider NMRI-Weibchen nach fünfmaliger Behandlung der Männchen mit 0, 250 bzw. 1000 mg Monolinuron/kg.

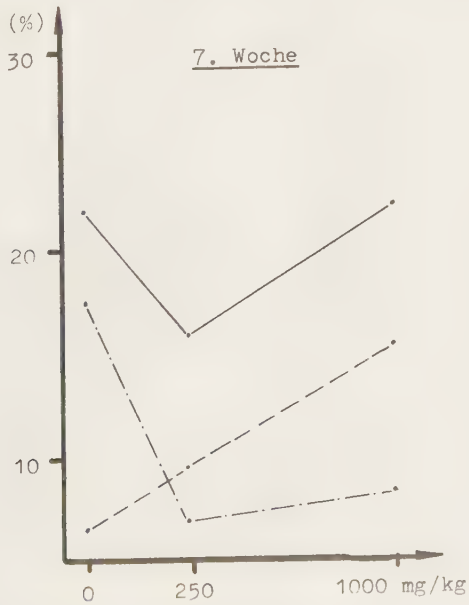
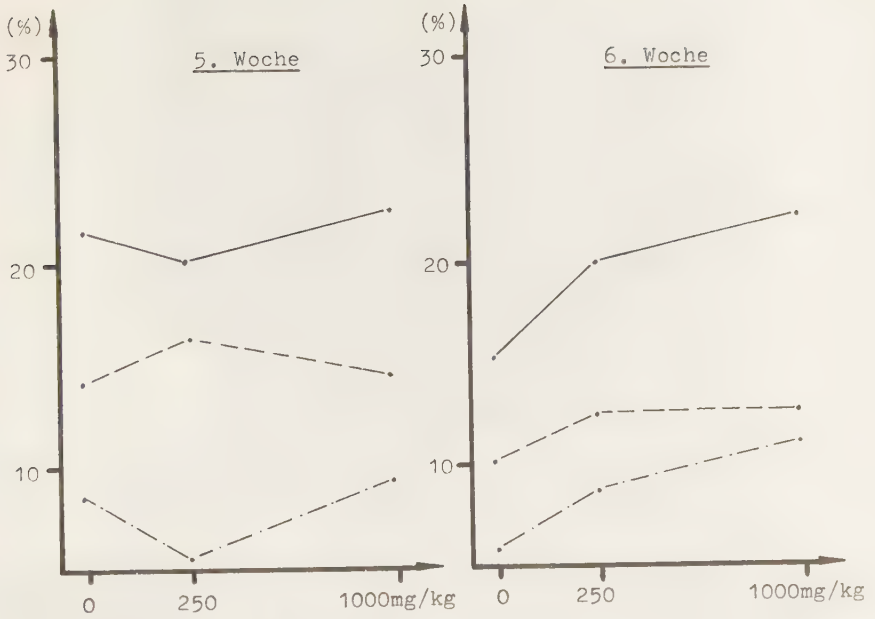


Abb. 25e-g

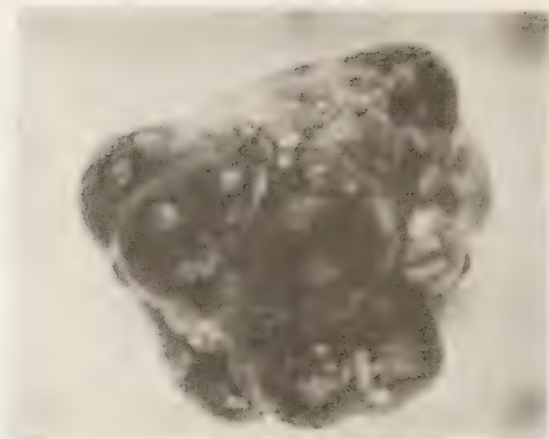


Abb. 26 : Ovar einer graviden NMRI-Maus mit Corpora lutea.



Abb. 27 : Uterus mit zwei Implantationsstellen (Ammonsulfidfärb.)



Abb. 28 : Uterus mit zahlreichen mittleren Resorptionsstadien am 15. Tag p.c. nach Gabe von 250 Monolinuron/kg



Abb. 29 : Mittlere Resorptionsstadien in situ
nach Gabe von 250 mg Monolinuron/kg



Abb. 30 und 31 : Späte Resorptionen (oben) und
tote Feten nach Gabe von 1000 mg Monolinuron/kg.

B. Buturon

In der Kontrollgruppe wurden 15 NMRI-Männchen fünf Tage lang mit täglich je 0,5 ml Oleum Arachidis oral behandelt. Die Versuchstiere erhielten im gleichen Zeitraum täglich 200 mg bzw. 350 mg Buturon/kg als ölige Suspension per Schlundsonde. Zwei Tage nach der letzten Applikation wurden die Männchen sieben Wochen lang mit je 2 Weibchen pro Woche verpaart. Zwischen dem 13. und 15. Tag der Trächtigkeit wurden die begatteten Weibchen seziiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 10 a - d zusammengefaßt und in den Abb. 32 und 33 dargestellt.

Die Fertilitätsprüfung (Tabelle 10 a, Abb. 32) wurde mit Hilfe der Bestimmung der Befruchtungsquote (Zahl der Weibchen mit Implantaten/Zahl der verpaarten Weibchen) durchgeführt. Bei den Kontrolltieren schwankte die Rate befruchteter Weibchen zwischen 80,0 % und 100 % und betrug durchschnittlich 89,5 %. Die Gabe von 200 mg Buturon/kg beeinflusste die Spermiogenese der Männchen zu keinem Zeitpunkt und die Befruchtungsquoten der Weibchen lagen im Bereich des Kontrollwertes. Die Applikation von 350 mg Buturon/kg führte in der ersten Verpaarungswoche zu einer signifikanten Erniedrigung der Befruchtungsquote auf 70,0 % ($P < 0,001$). Alle jüngeren Stadien der Spermiogenese wurden durch die Substanz nicht geschädigt, so daß keine signifikanten Abweichungen von den Werten der Kontrolltiere beobachtet werden konnten. Buturon hat also selbst nach fünfmaliger oraler Gabe an NMRI-Männchen keinen

Einfluß auf die Fertilität der Tiere. Die signifikante Erniedrigung dieses Parameters in der 1. Verpaarungswoche nach Gabe von 350 mg Buturon/kg - der nahezu maximal tolerierten Dosis bei mehrmaliger Gabe - war mit Sicherheit auf den schlechten Allgemeinzustand der Tiere (schlaaffe Lähmungen, Hypothermie) zurückzuführen.

Durch die Sektion der trächtigen Weibchen zwischen dem 13. und 15. Tag der Trächtigkeit wurde die Zahl der Corpora lutea, der Implantationsstellen sowie die Zahl der Resorptionen und der toten Feten festgestellt. Daraus wurden die prä- und postimplantativen Verluste errechnet (Tabelle 10b und 10c). Der präimplantative Verlust, d.h. die Differenz zwischen der Zahl der Corpora lutea und der Zahl der Implantationsstellen, betrug bei den Kontrolltieren durchschnittlich 10,5 % (Tabelle 10b). Die Gabe von 200 mg Buturon/kg bewirkte einen signifikanten Anstieg dieses Wertes auf 17,2 % ($P < 0,0001$) in der ersten Verpaarungswoche. Alle jüngeren Stadien der Spermiogenese blieben unbeeinflusst, so daß die präimplantativen Verluste der 2. - 7. Woche im Kontrollbereich lagen. Wurde den männlichen Tieren 350 mg Buturon/kg appliziert, konnte bei den Weibchen ein signifikanter Anstieg des präimplantativen Verlustes sowohl in der 1. Woche auf 15,3 % ($P = 0,005$) als auch in der 2. Woche auf 21,6 % ($P < 10^{-10}$) beobachtet werden. Von der höheren Dosis wurden also nicht nur die Spermien sondern auch die späten Spermatiden geschädigt. Ab der 3. Verpaarungswoche lagen die präimplantativen Verluste wieder auf

dem Kontrollniveau. Der postimplantative Verlust, d.h. die Zahl der Resorptionen und toten Feten, schwankte bei den Kontrolltieren zwischen 4,5 % und 13,2 % ; sie betrug im Durchschnitt 9,6 % (Tabelle 10c). Hauptsächlich wurden frühe Resorptionen gefunden. Späte Resorptionen und tote Feten wurden nur in geringer Zahl und zufällig verteilt gefunden. Bei beiden Versuchsgruppen konnte eine geringe Verschiebung des Verhältnisses frühe Resorptionen : späte Resorptionen : tote Feten in Richtung der späten Resorptionen und toten Feten festgestellt werden. Die Gesamtzahl aller toten Implantate blieb jedoch gleich und unterschied sich in beiden Versuchen zu keinem Zeitpunkt der Spermiogenese signifikant von den Kontrollwerten.

Die Gesamtverluste der Zygoten, die sich aus der Differenz der Anzahl der Corpora lutea und der Anzahl der lebenden Implantate ergaben, sind in Tabelle 10c und in der Abb. 33a-g dargestellt. Der Gesamtverlust bei den Weibchen der Kontrollgruppe schwankte zwischen 6,2 % und 28,9 % und betrug durchschnittlich 16,5 %. Nach der Applikation von 200 mg Buturon/kg konnte in der ersten Woche der Spermiogenese ein Anstieg des Gesamtverlustes der Zygoten bei den graviden Weibchen auf 27,2 % im Vergleich zum Durchschnittswert der Kontrolltiere beobachtet werden. Gegenüber dem gleichen Zeitraum des Kontrollversuchs konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Alle übrigen Stadien der Spermiogenese wurden von 200 mg Buturon/kg nicht beeinflusst. Die Gabe von 350 mg/kg hatte dagegen einen sehr deutlichen Effekt in der zweiten

Verpaarungswoche, d.h. auf die späten Spermatiden. Der Gesamtverlust der Zygoten betrug 32,5 % ; daraus errechnete sich eine Letalität von 0,166. Alle anderen Stadien der Spermiogenese wurden durch Buturon nicht geschädigt.

Verpaarungs= woche nach Substanzgabe	Verpaarte ♀♀			♀♀ mit Implantaten			Befruchtungsquote					
	K	200	350	K	200	350	K	200	P	350	P	
1.	30	38	40	26	37	28	86,7	84,2	≥ 0,1	70,0	≤ 0,001	
2.	30	38	40	24	36	38	80,0	94,7	≥ 0,1	95,0	≥ 0,1	
3.	30	38	40	28	33	37	93,3	86,8	≥ 0,1	97,5	≥ 0,1	
4.	30	38	40	24	35	34	80,0	92,1	≥ 0,1	85,0	≥ 0,1	
5.	30	38	40	30	34	37	100,0	89,5	≥ 0,1	92,5	≥ 0,1	
6.	30	30	40	26	28	38	86,7	93,3	≥ 0,1	95,0	≥ 0,1	
7.	29	40	40	29	40	36	100,0	100,0	≥ 0,1	90,0	≥ 0,1	

Tabelle 10a : Fertilitätsprüfung männlicher NMRI-Mäuse nach fünfmaliger oraler Behandlung mit 0, 200 bzw. 350 mg Buturon/kg.

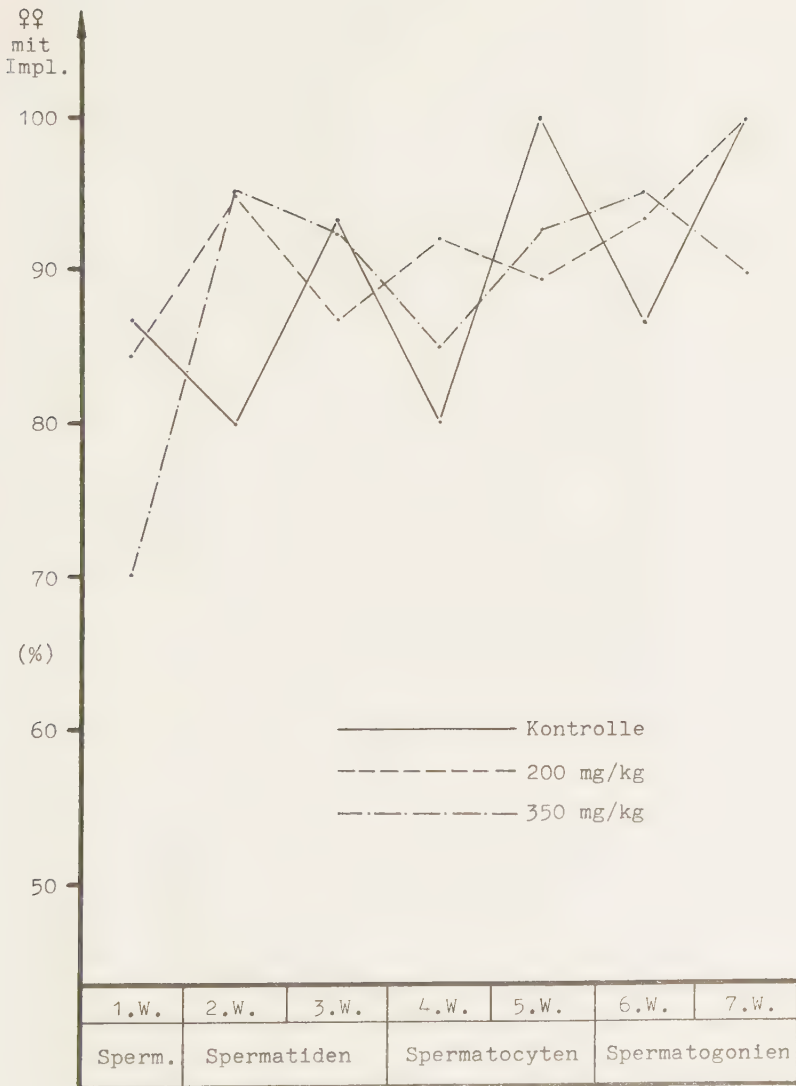


Abb. 32: Fertilitätsprüfung männlicher NMRI-Mäuse nach fünfmaliger oraler Behandlung mit 0, 200 bzw. 350 mg Buturon/kg.

Ver- paar. woche nach Sti- gbe	♀♀ mit Implantaten				Anzahl der Corpora lutea				Anzahl der Implantate				Präimplantativer Verlust							
	K		200		K		200		K		200		K		200		350			
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
1.	16	32	28	35,6	12	37	280	341	320	76	21,3	71	17,2	0,0001	58	15,3	0,005			
2.	24	36	38	37	449	477	303	404	374	21	6,5	41	9,1	0,05	103	11,6	$<10^{-10}$			
3.	28	33	37	35,8	431	497	326	397	442	42	11,4	34	7,9	0,05	55	11,1	0,05			
4.	24	35	34	31,9	490	464	300	44	408	19	6,0	45	9,1	0,05	36	7,8	0,05			
5.	30	34	37	42,1	455	505	396	404	449	26	6,2	51	11,2	0,05	56	11,1	0,05			
6.	26	28	38	32,3	387	527	279	35	488	44	13,6	35	9,0	0,05	39	7,4	0,05			
7.	29	40	36	36,5	562	431	333	48	391	32	8,8	80	14,2	0,01	40	9,3	0,05			

Tabelle 10b: Präimplantativer Verlust gravider NMPI-Mäuseweibchen nach fünfmaliger Behandlung der männlichen Tiere mit 0, 200 bzw. 350 mg Buturon/kg.

Ver- paar- woche nach Injekt. gabe	Zahl d. Implantate		Lebende Implantate		Postimplantativer Verl.						Gesamtverlust				Letalität					
	K	200	350	K	200	350	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	K	(n)	(%)	(n)	(%)	200	350	
1.	380	441	370	253	300	290	27	9,6	41	12,0	30	9,4	103	28,0	112	27,2	88	23,7	0,100	0,050
2.	303	408	374	267	378	322	40	13,2	30	7,3	30	13,9	61	18,8	71	15,8	155	32,5	0,041	0,146
3.	326	377	440	299	349	402	27	8,3	48	15,1	40	9,0	69	18,8	82	14,0	95	16,1	0,001	0,000
4.	300	455	473	262	414	393	32	12,7	31	7,0	35	8,2	51	16,0	76	15,5	71	1,3	0,044	0,047
5.	396	404	400	353	356	412	42	10,6	48	11,9	37	8,2	26	6,2	99	21,8	43	13,4	0,033	0,009
6.	373	445	445	248	305	438	30	11,8	47	13,4	50	10,2	44	13,6	82	21,2	8	16,9	0,026	0,027
7.	322	401	401	318	439	361	15	4,6	42	8,7	30	7,7	47	12,9	123	21,9	70	1,2	0,034	0,036

Abbildung 10c: Postimplantativer Verlust und Gesamtverlust gravider NMRI-Mäuseweibchen und Letalität aller Cygoten nach fünfmaliger Behandlung der männlichen Tiere mit 0, 200 bzw. 350 mg Puturon/kg.

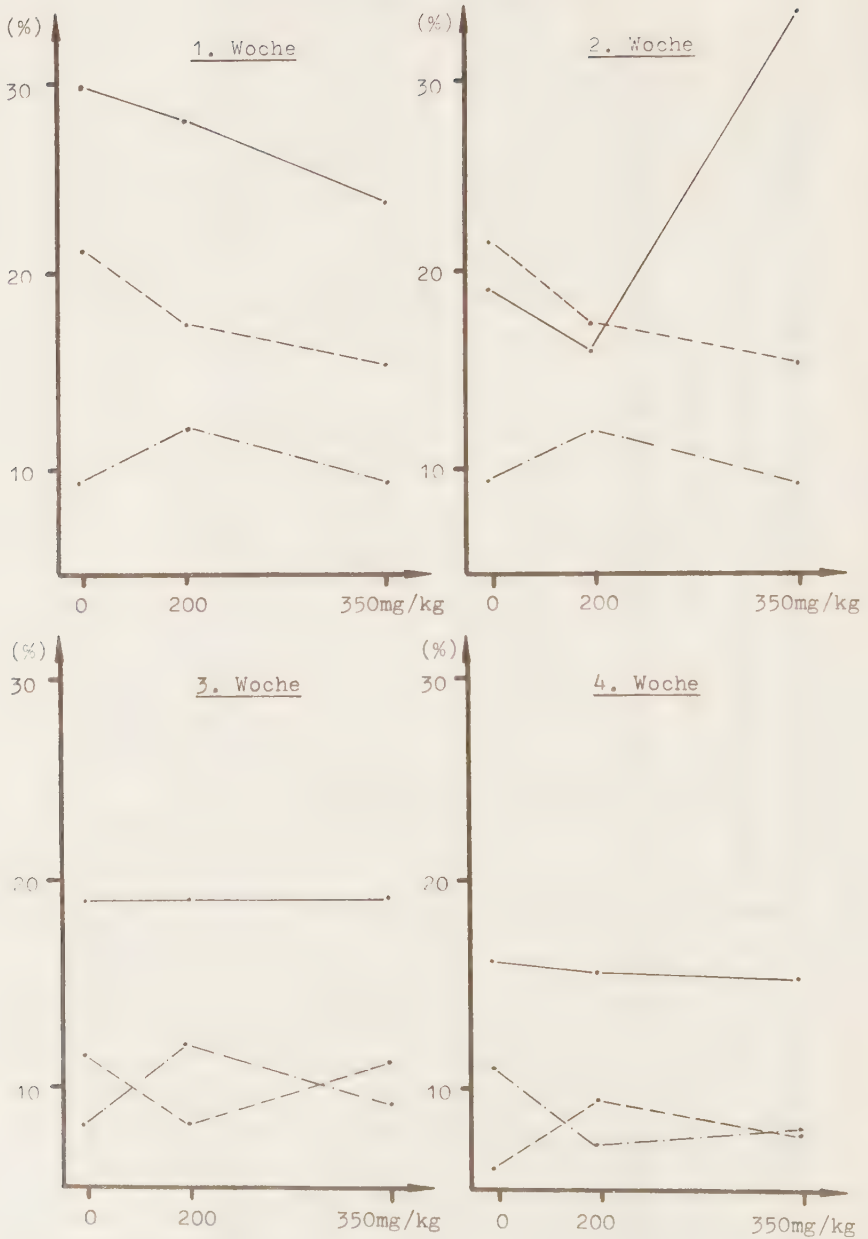
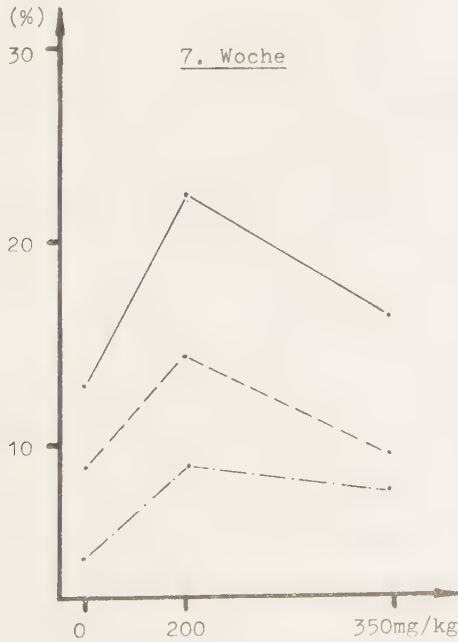
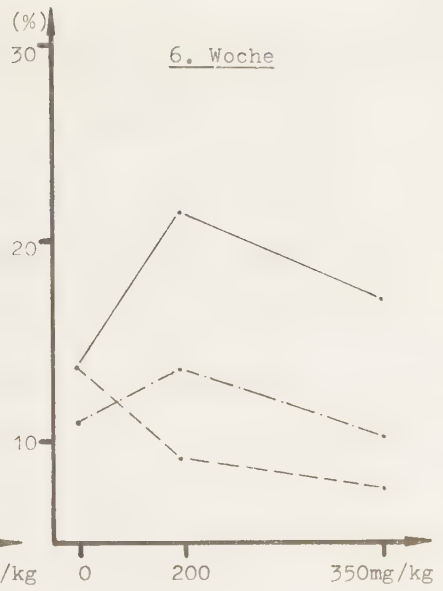
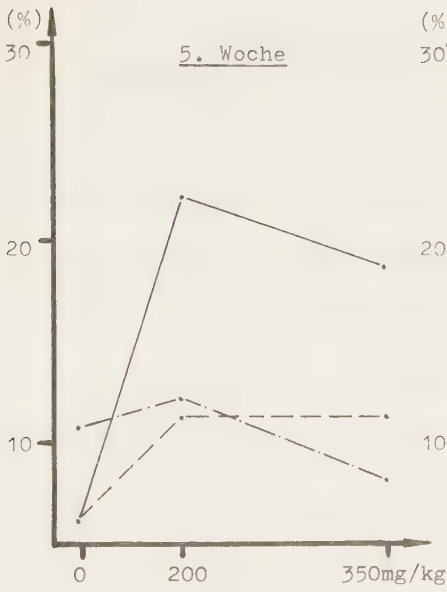


Abb. 33a-d: Präimplantativer (---), Postimplantativer (-.-.-) und Gesamtverlust (—) gravider NMRI-Weibchen nach fünfmaliger Behandlung der Männchen mit 0, 200 bzw. 350 mg Buturon/kg.



b. Chromosomendarstellung aus Knochenmarkszellen

Zur Bestimmung des Mitoseindex wurden die Knochenmarkpräparate bei 450facher Vergrößerung beobachtet und der prozentuale Anteil der in Mitose befindlichen Zellen bei 1000 - 2000 Zellen bestimmt. Gut differenzierte und ausgebreitete Metaphaseplatten wurden unter Ölimmersion bei 1650 - 2000facher Vergrößerung beurteilt. Pro Tier wurden ferner 50 Metaphasen untersucht und der Prozentsatz aberranter Chromosomen bestimmt.

Die Kontrollgruppe umfaßte 10 weibliche NMRI-Mäuse. Sie erhielten je 1 ml Oleum Arachidis per Schlundsonde und wurden 16 h danach getötet. Der Mitoseindex der Proerythrocyten des Knochenmarks betrug durchschnittlich 4,73 % und schwankte zwischen 2,99 % und 6,68 % (Tabelle 11).

Tier Nr.	Zahl der untersuchten Zellen	Zellen in Mitose	
		(n)	(%)
1	1684	89	5,29
2	1401	72	5,14
3	1741	52	2,99
4	1395	49	3,78
5	1515	101	6,67
6	1340	68	5,07
7	1624	61	3,76
8	1433	70	4,88
9	1467	98	6,68
10	1323	41	3,10
1-10	14823	701	4,73

Tabelle 11 : Mitoseindex der Proerythrocyten im Knochenmark von 10 Kontrollweibchen des NMRI-Stammes.

Von jedem Kontrolltier wurden 50 Metaphaseplatten auf numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen untersucht. Es wurden nur Zellen mit vollständigem Chromosomensatz ($2n = 40$) ausgewertet. Polyploide Zellen wurden nur vereinzelt gefunden. Die Abb. 38 zeigt das normale Karyogramm der weiblichen NMRI-Maus. Die Größe der 38 acrozentrischen Autosomen und der 2 ebenfalls acrozentrischen Geschlechtschromosomen schwankte zwischen 1μ und 10μ . Strukturelle Unterschiede, die eine genaue Identifikation ermöglichen könnten, wurden nicht beobachtet (FORD und WOOLLAM, 1963 ; LEVAN et al., 1962). Bei den Kontrolltieren konnten keine Chromosomenaberrationen gefunden werden. In 500 Mitosezellen traten lediglich 19 achromatische Läsionen ("gaps") auf, die sich auf 11 Metaphaseplatten verteilten.



Abb. 34 : Das normale Karyogramm der weiblichen NMRI-Maus

A. Monolinuron

Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt eine einmalige orale Gabe von 400 mg (12 Tiere) bzw. 800 mg Monolinuron/kg (12 Tiere). Der zweiten Gruppe wurde die Substanz in gleicher Dosis zweimal im Abstand von 24 Stunden oral appliziert. Jeweils 3 Tiere wurden 6, 16, 24 und 48 h nach der letzten Substanzgabe getötet, Chromosomenpräparate angefertigt und der Mitoseindex bestimmt. Die Werte wurden zur Berechnung zusammengefaßt (Tabelle 12) und in Abb. 35 graphisch dargestellt.

Die Mitoseindices nach einmaliger oraler Applikation von 400 mg bzw. 800 mg/kg lagen im Schwankungsbereich des Kontrollwertes (Tabelle 11). Für den Mitoseindex 2,9 %, der 16 Stunden nach Gabe von 800 mg Monolinuron/kg beobachtet wurde, war allerdings Signifikanz gegenüber dem Mittelwert der Kontrolltiere gegeben ($P < 10^{-5}$).

Die zweimalige Gabe von 400 mg Monolinuron/kg im Abstand von 24 h senkte den Mitoseindex 6 h und 16 h nach der letzten Substanzgabe auf 3,4 % signifikant gegenüber dem Kontrollwert von 4,7 % ($P = 10^{-5}$), obwohl der Wert noch im physiologischen Schwankungsbereich lag. Nach 24 h sank der Wert auf 2,6 % und sank damit unter die Variationsbreite der Kontrolltiere. Noch deutlicher war der mitostatische Effekt nach der zweimaligen Verabreichung von 800 mg Monolinuron/kg. Bereits 6 h nach der letzten Substanzgabe sank die Teilungsaktivität der Knochenmarkzellen auf 1,4 % ($P < 10^{-10}$). Diese Werte

wurden über 24 h beibehalten und erst nach 48 h wurde wieder ein Mitoseindex im Kontrollbereich ermittelt (3,6 %).

Von jedem Tier wurden je 50 Metaphasen auf Aberrationen untersucht (2400 Metaphasen von 48 Tieren). Es konnten keine Chromosomenanomalien beobachtet werden. In den 2400 Metaphaseplatten wurden 67 Chromosomen mit "gaps" gefunden, die sich auf 51 Zellen verteilten.

Mitoseindex des Kontroll= versuchs (%)	Zeit nach der Substanz= gabe (h)	400 mg Monolinuron/kg (1 mal)			800 mg Monolinuron/kg (1 mal)		
		Untersuchte Zellzahl (n)	Zellen in Mitose (n)	(%)	Untersuchte Zellzahl (n)	Zellen in Mitose (n)	(%)
5,3	6	4126	277	5,5	4108	164	4,0
5,1	16	3851	177	4,6	3952	114	2,9
3,0	24	3907	167	4,2	3937	153	3,9
3,8	48	4098	233	5,7	3824	156	4,1
6,7							
5,1							
3,8							
4,9							
5,7							
3,1							
		(2 mal)			(2 mal)		
	6	3822	130	3,4	3718	52	1,4
	16	4180	142	3,4	4115	65	1,5
	24	4006	104	2,6	3956	59	1,5
	48	3987	111	2,8	3981	143	3,5

Tabelle 12 : Mitoseindex im Knochenmark weiblicher NMRI-Mäuse nach ein- (oben)
bzw. zweimaliger (unten) Gabe von 400 mg bzw. 800 mg Monolinuron/kg.



Abb. 35 : Mitoseindex im Knochenmark weiblicher NMRI-Mäuse nach ein- bzw. zweimaliger Gabe von 0, 400 bzw. 800 mg Monolinuron/kg.

B. Buturon

Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt eine einmalige orale Gabe von 300 mg (12 Tiere) bzw. 600 mg Buturon/kg (12 Tiere). Der zweiten Gruppe wurde die Substanz in gleicher Dosis zweimal im Abstand von 24 Stunden oral appliziert. Jeweils 3 Tiere wurden 6, 16, 24 und 48 h nach der letzten Substanzgabe getötet. Danach wurden Chromosomenpräparate angefertigt und der Mitoseindex bestimmt. Die Werte wurden zur Berechnung zusammengefaßt (Tabelle 13) und in Abb. 36 graphisch dargestellt.

Die einmalige Applikation von 300 mg bzw. 600 mg Buturon/kg beeinflusste den Mitoseindex der Tiere nicht. Alle Werte lagen im Bereich der Schwankungsbreite der Kontrolltiere (Tabelle 11).

Nach zweimaliger Gabe von 300 mg/kg im Abstand von 24 h konnten 6 h und 16 h nach der letzten Substanzgabe Mitoseindizes beobachtet werden, die unterhalb des Kontrollbereiches lagen (2,6 % und 2,9 %) und gegenüber dessen Mittelwert (4,7 %) signifikant erniedrigt waren. ($P < 10^{-5}$). Nach 24 h waren wieder Normalwerte erreicht. Einen noch stärkeren mitostatischen Effekt bewirkte die zweimalige Gabe von 600 mg Buturon/kg. 16 h nach der Substanzapplikation lag der Mitoseindex mit 2,0 % signifikant unter den Kontrollwerten ($P < 10^{-10}$). Nach 24 h lag er mit durchschnittlich 2,7 % immer noch unter den Normalwerten ($P < 10^{-5}$) und erreichte erst 48 h nach der letzten Substanzgabe wieder das Kontrollniveau (6,1%).

Von jedem Tier beider Versuchsgruppen wurden 50 gut ausgebreitete Metaphaseplatten auf Chromosomenanomalien untersucht. In den Chromosomen der 2400 Metaphasen von 48 Tieren wurden keine numerischen oder strukturellen Aberrationen gefunden, die über den Kontrollwert hinausgingen. Die beobachteten 48 "gaps" verteilten sich gleichmäßig auf 42 Zellen aller Applikationsstadien.

Mitoseindex des Kontroll= versuchs (%)	Zeit nach der Substanz= gabe (h)	300 mg Buturon / kg (1 mal)			600 mg Buturon / kg (1 mal)		
		Untersuchte		Zellen in	Untersuchte		Zellen in
		Zellzahl (n)	Mitose (%)	Mitose (n) (%)	Zellzahl (n)	Mitose (n) (%)	Mitose (n) (%)
5,3	6	4150	178	4,3	3869	193	5,0
5,1	16	4218	248	5,9	3971	190	4,8
3,0	24	3959	205	5,2	3955	158	4,0
3,6	48	4058	219	5,4	4048	222	5,5
6,7		(2 mal)			(2 mal)		
5,1	6	3959	102	2,6	4112	131	3,2
3,8	16	4076	118	2,9	4114	82	2,0
4,9	24	4100	180	4,4	3970	107	2,7
6,7	48	3954	170	4,3	4000	244	6,1
3,1							

Tabelle 13 : Mitoseindex im Knochenmark weiblicher NMRI-Mäuse nach ein- (oben)
bzw. zweimaliger (unten) Gabe von 0, 300 bzw. 600 mg Buturon/kg

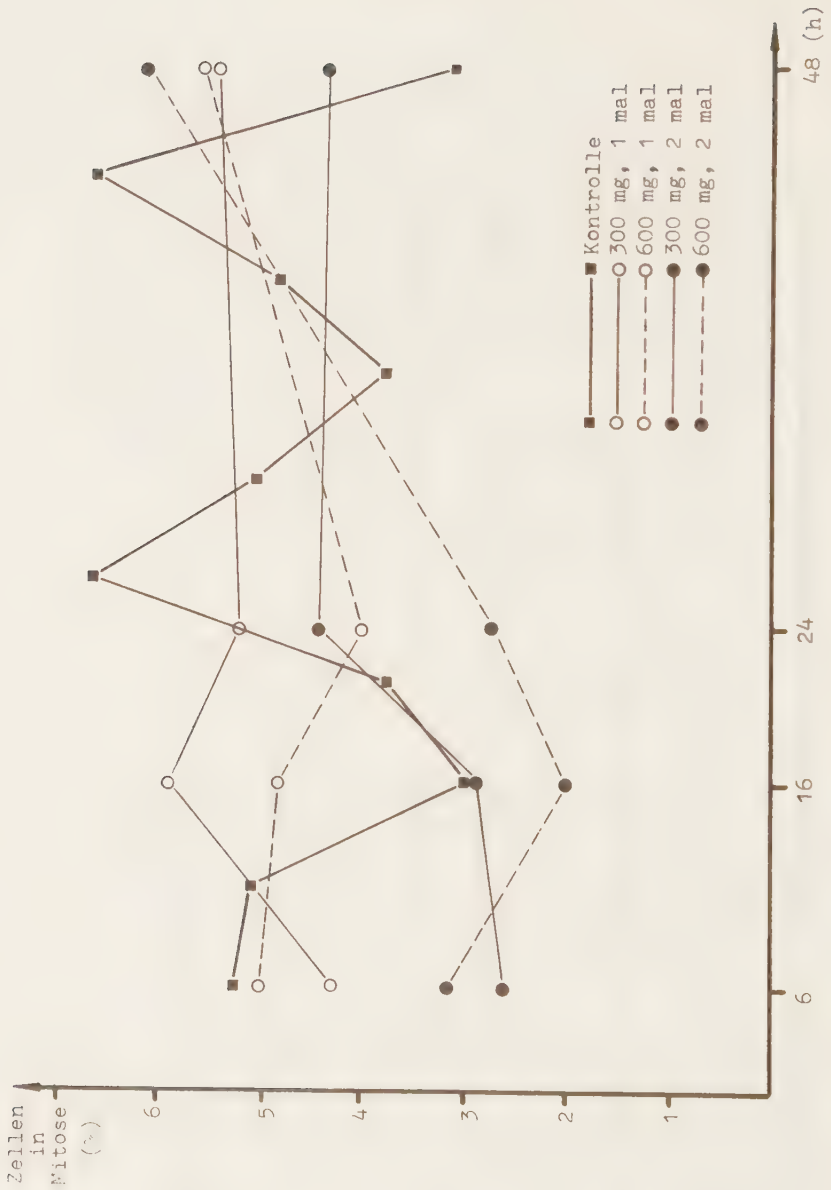


Abb. 36 : Mitoseindex im Knochenmark weiblicher NMRI-Mäuse nach ein- bzw. zweimaliger Gabe von 0, 300 bzw. 600 mg Buturon/kg.

Diskussion

Zwischen der chemischen Struktur eines Stoffes und seiner teratogenen Wirkung besteht nach heutigen Kenntnissen kein eindeutiger Zusammenhang. Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und mutagener Wirkung sind bisher nur für alkylierende Substanzen und Nukleinsäureantimetaboliten bewiesen. Da man aus "verdächtiger" chemischer Struktur keine Schlüsse ziehen kann, hat man eine große Anzahl von Tests zur Untersuchung auf Teratogenität und Mutagenität von Substanzen entwickelt. Diese Tests müssen praktikable Routine-tests sein, die gut standardisiert und u. U. teilweise automatisiert werden können. Außerdem sollten sie mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit Rückschlüsse auf die Teratogenität und Mutagenität beim Menschen zulassen. Eine Expertengruppe für Pestizidrückstände in der Nahrung der World Health Organisation (WHO) hat 1969 gefordert, daß Dosis-Wirkungskurven und Toleranzen für Teratogene, Mutagene und Cancerogene festgelegt werden müßten. Dies bedeutet jedoch nicht, daß eine Substanz, die bei einer oder mehreren Spezies solche Effekte zeigt, nicht verwendet werden darf. Vielmehr müssen entsprechende Sicherheitsgrenzen geschaffen werden, die den Nutzen eines Stoffes gegen das Risiko für den Menschen abwägen. Deshalb nimmt die Frage der Nulltoleranz, der Nachweisgrenzen, der erlaubten Gehalte und der Schwellenwerte immer mehr an Bedeutung zu (COULSTON, 1974). Bei allen Untersuchungen zu diesem Problem stellt sich grundsätzlich die Frage, ob in vitro - Untersuchungen für die Beurteilung einer

Substanz ausreichend sind, oder ob zusätzlich Versuche in vivo durchgeführt werden sollten. Es gibt Stoffe, die nur in vitro wirksam werden, weil sie im lebenden Organismus zu inaktiven Verbindungen ab- oder umgebaut werden. Andere Substanzen werden erst durch die Metabolisierung wirksam. Man muß also unterscheiden zwischen Originalsubstanzen und ihren Metaboliten (DRUCKREY und RAABE, 1952). Schließlich sind Substanzen bekannt, die in beiden Testsystemen (wenn auch meist mit unterschiedlicher Stärke) wirksam sind, da sowohl die Originalsubstanz als auch ihre Metaboliten teratogen bzw. mutagen sind. Im in vitro - Test stellen Zellen oft ihre Teilung schon bei Anwesenheit des Lösungsmittels ein. Da viele organische Substanzen nur schwer in Lösung zu halten sind, ist eine Verdünnung des Lösungsmittels mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung oft nicht möglich, ohne daß das Löslichkeitsprodukt unterschritten wird. In diesem Fall muß auf andere Lösungsmittel (DMSO, Tween etc.) ausgewichen werden.

Für die Untersuchung eines Agens auf seine Teratogenität beim Säuger sollten die Versuchstiere in physiologischer Hinsicht (Stoffwechsel, Entwicklung) dem Menschen möglichst ähnlich sein. Außerdem muß die Normogenese gut bekannt sein, denn es sind vielseitige Wechselbeziehungen zwischen Muttertier und Fetus zu berücksichtigen. Die Maus bietet sich deshalb als Versuchstier für teratologische Untersuchungen an, weil sie unter den Säugetieren genetisch und immunbiologisch am besten untersucht ist und die Nidation ähnlich wie beim Menschen in einer Placenta hämochorialis erfolgt.

Die verschiedenen Mäusestämme bereiten allerdings dem teratologischen Experiment eine bedeutende Schwierigkeit: Zum einen sind die spontanen Mißbildungsraten oft sehr unterschiedlich, zum anderen variiert die Empfindlichkeit einzelner Stämme gegenüber teratogenen Noxen beträchtlich, wie KALTER (1964) bei der Auslösung von Gaumenspalten an verschiedenen Mäusestämmen zeigen konnte. Außerdem konnte beobachtet werden, daß Mißbildungen, die bei einem Stamm bereits spontan vorkommen, unter dem Einfluß einer Noxe gehäuft auftreten. Die Ursache dafür könnten Gene mit geringer Penetranz sein, die erst durch die Addition einer exogenen Noxe eine größere Penetranz bzw. stärkere Expressivität erlangen (HADORN, 1955).

Wird einem graviden Versuchstier eine Substanz zugeführt, so sind grundsätzlich zwei Konsequenzen möglich: Einerseits kann die Noxe den Stoffwechsel überfordern (Letaldosis). Dieser Grenzwert wird mit der Bestimmung der LD₅₀ ermittelt. Andererseits kann die Noxe im mütterlichen oder nach der Plazentapassage im fetalen Organismus vollständig und ohne Effekt toleriert werden oder sie führt zu Mißbildungen. Die Reaktion wird durch die applizierte Dosis, durch die Entwicklungsphase des entstehenden Organismus und durch das Verhalten der Substanz bei der Metabolisierung im maternalen Stoffwechsel und beim Übertritt der Plazentaschranke bestimmt (KREYBIG, 1968). Die Plazenta ist also nicht nur Eintrittspforte für Nährstoffe, sondern auch für pathogene Keime und chemische Substanzen in das Dottersackepithel. Welcher Natur allerdings die reagierenden Systeme bestimmter Blasteme und Präblasteme sind, ist

noch ungeklärt. Ob sie primär im Nukleus (DNS-Stoffwechsel) oder im Protoplasma (RNS, Mitochondrien, Proteine, Fermente) lokalisiert sind, bleibt im Einzelfall zu ergründen. Die Applikation der Testsubstanz an gravide Tiere bringt nicht nur Aufschlüsse über die prä- und postimplantativen Verluste, sondern erlaubt außerdem eine Feststellung teratogener Effekte durch Inspektion oder besondere Aufarbeitung der Feten. Der Test erfordert allerdings eine relativ große Zahl von Tieren und etwa 4 Wochen Zeit für einen Versuch und dessen Auswertung. Die Trächtigkeitsdauer der Maus beträgt 19 - 20 Tage; für die Aufarbeitung der Feten benötigt man etwa 5 Tage. Bei den Untersuchungen der beiden Herbizide Monolinuron und Buturon setzten wir insgesamt ca. 750 Tiere ein und konnten für beide Testsubstanzen eine teratogene Wirkung nachweisen. Die orale Applikation von Monolinuron vom 6. - 15. Tag der Gravidität erhöhte bei einer Dosierung von 800 mg und 1000 mg/kg die postimplantativen Verluste signifikant auf etwa 35 % gegenüber 10 - 15 % bei den Kontrolltieren. Betroffen waren hauptsächlich die frühen Stadien vor der Plazentation. Ein ähnliches Ergebnis wurde nach der oralen Gabe von Buturon vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit beobachtet. Der postimplantative Verlust stieg durch vermehrte frühe Resorptionen auf 20,8 % nach 375 mg/kg und 27,7 % nach 400 mg/kg. Die präimplantativen Verluste, d. h. die vor der Nidation zugrundegegangenen Blastocysten, bewegten sich in den Grenzen der Kontrollwerte. Man kann also sagen, daß sowohl durch Monolinuron als auch durch Buturon ein dosisabhängiger, monophasischer Letaleffekt induziert wurde, der besonders im Trophoblastenstadium zwischen

der Nidation (5./6. Tag) und der Plazentation (9./10. Tag), d. h. in der Phase der Primitivorganogenese von Organfeldern, Somiten, Neuralrohr, Chorda, Blutinseln und Herzschlauch, zum pränatalen Tod führte. Als Zeichen dieser primären toxischen Reaktion der frühen Entwicklungsstadien blieb die Gewichtszunahme der Muttertiere ab 800 mg Monolinuron/kg und ab 400 mg Buturon/kg signifikant hinter der der Kontrolltiere zurück. Die Fetengewichte erniedrigten sich ebenfalls linear dosisabhängig ab 200 mg Monolinuron/kg bis auf 0,74 g bei 1000 mg/kg bzw. ab 300 mg Buturon/kg bis auf 0,97 g bei 400 mg/kg gegenüber dem Durchschnittsgewicht der Kontrollfeten (etwa 1,20 g). Hinsichtlich der teratogenen Wirkung ergaben sich für beide Substanzen Dosis-Wirkungsbeziehungen. Als stamnesspezifische Mißbildung der NMRI-Mäuse wurden bei 1 % der Kontrolltiere Gaumenspalten gefunden. Sonstige Fehlbildungen (z.B. Exencephalien, Exenterien, gewellte oder verwachsene Rippen und Skoliosen) traten nur ganz vereinzelt auf. Die orale Verabreichung von Monolinuron bewirkte einen Anstieg der Mißbildungsrate. Die Zahl der Gaumenspalten erhöhte sich bereits nach Applikation von 100 mg/kg signifikant auf 3,9 % und stieg bis zu der Dosis von 1000 mg/kg auf 35,9 %. In den beiden höchsten Konzentrationen konnte auch eine Zunahme hypoplastischer Oberkiefer auf 4,4 % bzw. 11,7 % beobachtet werden. Gewellte und verwachsene Rippen wurden nach Gabe von 400 mg Monolinuron/kg vermehrt gefunden, jedoch war für diese Mißbildung keine Dosis-Wirkungsbeziehung gegeben. Für Exencephalien, Exenterien, Mikrognathien und Skoliosen ergaben sich im Vergleich zum Kontrollver-

such keine signifikant veränderten Werte. Zur Überprüfung der Phasenspezifität von Monolinuron in der Embryogenese der NMRI-Maus wurde die Substanz am 10. und 11. Tag sowie am 12. und 13. Tag der Gravidität in einer Dosierung von 500 mg/kg verabreicht. Außer einer Erniedrigung der Fetengewichte konnte kein Effekt beobachtet werden. Der Einfluß auf die Gewichtsentwicklung der Feten war bei Gabe vom 10. - 13. Tag nicht so gravierend wie bei der Gabe am 12. und 13. Tag p.c. Diese Tatsache spricht für einen Adaptationseffekt. Monolinuron zeigte keine Phasenspezifität, denn nach 500 mg/kg am 12. und 13. Tag der Trächtigkeit wurden im Vergleich mit dem Kontrollversuch nur wenige Gaumenspalten gefunden (4,1 %).

Die Verabreichung von Buturon vom 6. - 15. Tag bewirkte einen ausgeprägteren teratogenen Effekt. Der Anteil der Gaumenspalten stieg nach der Gabe von 300 mg/kg auf 5,6 %, nach 400 mg/kg auf 15,1 % gegenüber 1,2 % bei den Kontrolltieren und der Prozentsatz der Tiere mit verwachsenen Rippen erhöhte sich auf 3,5 %, die der mit Exenterien auf 4,3 % gegenüber jeweils 0,3 % im Kontrollversuch. Exencephalien und Mikrognathien traten nur vereinzelt auf. Buturon zeigte auch eine Phasenspezifität in der Embryogenese der NMRI-Maus. Während der postimplantative Verlust nach Gabe von 350 mg Substanz/kg am 10. und 11. Tag p.c. unbeeinflusst blieb, stieg er nach Applikation am 12. und 13. Tag auf 27,0 %. Wurde die Substanz vom 10. - 13. Tag p.c. gegeben, trat ein Adaptationseffekt ein, so daß der postimplantative Verlust nur 17,6 % betrug. Gleichzeitig sank das Fetenge-

wicht von 1,20 g (Kontrolle) signifikant auf 1,08 g. Die Verabreichung von Buturon am 10. und 11. Tag führte nicht zu einer Erhöhung der Zahl der Gaumenspalten, bei Gabe am 12. und 13. Tag der Gravidität wurden dagegen 13,3 ‰ und bei Gabe vom 10. - 13. Tag 11,0 ‰ Gaumenspalten gegenüber 1,2 ‰ bei den Kontrolltieren beobachtet. Die Mißbildungsrate lag damit nach zweimaliger bzw. viermaliger Applikation etwa ebenso hoch wie nach zehnmaliger Gabe der Substanz vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit.

Bei Betrachtung der durch Monolinuron und Buturon induzierten Mißbildungen erhebt sich die Frage, ob diese Phänotypen bekannter Mutationen bei der Maus sind. Verbogene und verwachsene Rippen werden bei den Mutationen "diminutive" (STEVENS und MACKENSEN, 1958), "undulated" (GRÜNEBERG, 1950c, 1954c ; WRIGHT, 1947) und "rib fusions" (MACKENSEN und STEVENS, 1960 ; THEILER und STEVENS, 1960) gefunden, bei letzterer oft mit Skoliosen und Exencephalien vergesellschaftet. Auf die Tatsache, daß die Gaumenspalten eine typische spontane Mißbildung bei den NMRI-Mäusen darstellen, wurde bereits hingewiesen.

Um auch die postnatale Phase im teratologischen Experiment zu erfassen, wurde im Aufzuchtversuch der normale Würftermin abgewartet und die Jungtiere während der 3 Wochen dauernden Laktationsperiode beobachtet. Im Kontrollversuch wurde ein postimplantativer Verlust von 19,2 % registriert. Die Würfe enthielten 1,2 ‰ tote Feten und in den ersten drei Lebenswochen starben 6,2 ‰ der Jungtiere. Bei den Nachkommen

wurden insgesamt 2,1 % Gaumenspalten gefunden. Das durchschnittliche Geburtsgewicht betrug 1,56 g und das Absetzgewicht nach drei Wochen 9,75 g. Die Applikation von 200 mg Monolinuron/kg hatte keinen Einfluß auf die Gewichte der Jungtiere, die Zahl der Totgeburten und verstorbenen Tiere. Nach der Gabe von 500 mg Monolinuron/kg erhöhte sich die Gesamtmortalität im Vergleich zur Kontrolle von 7,5 % auf 28,9 % ; 7,1 % der Feten waren Totgeburten und 21,7 % der Jungtiere starben in der Laktationsperiode. Das Geburtsgewicht der Feten war mit 1,39 g signifikant erniedrigt, das Defizit wurde jedoch bis zum Absetztermin ausgeglichen. Die Zahl der Gaumenspalten bei den Jungtieren war auf 9,9 % signifikant erhöht. Wurde den graviden Weibchen 200 mg Buturon/kg verabreicht, veränderte sich gegenüber der Kontrolle weder der postimplantative Verlust, noch die Zahl der Totgeburten. Die Gewichtsentwicklung der Feten und Jungtiere war normal und die Zahl der Gaumenspalten wich nicht vom Kontrollwert ab. Trotzdem stieg die Gesamtmortalität auf 20,1 % gegenüber 7,5 % bei den Kontrolltieren. Ein ähnliches Ergebnis wurde nach der Gabe von 350 mg Buturon/kg beobachtet: Die Gesamtmortalität betrug 18,0 % ; allerdings hatten in diesem Versuch 9,0 % der Jungtiere Gaumenspalten (Kontrolle 2,1 %). Durch die Aufzuchtversuche ließen sich die teratologischen Untersuchungen durch folgende Aussagen ergänzen: Monolinuron und Buturon beeinflussten nicht nur die vorgeburtliche sondern auch die postnatale Phase der NMRI-Mäuse. 200 mg Monolinuron/kg hatte noch kei-

nen Einfluß auf die Zahl der Totgeburten und die Entwicklung der Jungtiere, 200 mg Buturon/kg dagegen bewirkte eine erhöhte Mortalität während der Laktationszeit ohne äußerlich erkennbare Ursachen. Dabei starben alle Jungtiere mit Gaumenspalten. Es wäre denkbar, daß die Tiere an einer Aspirationspneumonie verstarben, da wegen der Gaumenspalten die Muttermilchaufnahme beeinträchtigt war. Die Dosierung von 500 mg Monolinuron/kg ließ die Mortalität weiter ansteigen, wobei sich etwa 1/4 auf die Totgeburten und 3/4 auf die in den ersten drei Lebenswochen verstorbenen Jungtiere verteilte. Die Erhöhung der Gesamtmortalität nach der Gabe von 350 mg Buturon/kg kam wiederum erst in der postnatalen Phase zustande. Hierin waren allerdings 9,0 % Tiere mit Gaumenspalten eingeschlossen (gestörte Nahrungsaufnahme). Beide Substanzen induzierten also außer den pränatalen Letaleffekten und teratogenen Wirkungen noch postnatale Letaleffekte, die zum Tod innerhalb der Laktationsperiode von drei Wochen führten. Dabei wäre an Organmilbildungen zu denken.

Von den z.Z. eingesetzten Herbiziden haben sich einige als teratogen erwiesen. Aus der Gruppe der Nitrophenole konnte bei 2-Butyl-4,6-nitrophenol (= Dinoseb^R) eine teratogene Wirkung durch GIBSON (1973) und FREACHE und GIBSON (1974) beobachtet werden. Sie fanden bei Swiss-Webster-Mäusen Atresiae ani, Acaudien, Ihokomelien (Fehlen der Tibia) und Rippenverwachsungen. Die quartären Ammoniumverbindungen Chlorcholinchlorid (CCC) und 1,1'-Dimethyl-4,4'-dipyridylium-

dichlorid (= Paraquat) lösten ebenfalls im Tierversuch Mißbildungen aus. JUSKIEWICZ et al. (1970) beobachteten nach Behandlung von Hamstern mit CCC Exencephalien, Anophthalmien sowie Polydaktylien und KHERA und WHITTA (1968) fanden nach Applikation von Paraquat bei Ratten Rippenmißbildungen. Auch in der großen Gruppe der Phenoxyessigsäurederivate konnten einige Substanzen mit teratogener Wirkung festgestellt werden. Nach Gabe von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (= 2,4-D) beobachteten COLLINS und WILLIAMS (1971) bei Hamstern Rippenmißbildungen und KHERA und McKINLEY (1972) bei Ratten eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Gaumenspalten. Sehr umfangreiche Untersuchungen liegen über 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) vor. Ein schweres Mißbildungssyndrom mit "chick face", Augen- und Schnabelanomalien, Gaumenspalten und kurzer, krummen Beinen bei Hühnerküken wurde von VERRETT (1970) beschrieben. COURTNEY et al. (1970) fanden bei C57BL- und AKR-Mäusen und COURTNEY und MOORE (1971) bei Charles-River- und DBA-Mäusen nach Gabe von 2,4,5-T Gaumenspalten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ROLL (1971) sowie NEUBERT und DILLMANN (1972) bei NMRI-Mäusen ferner KHERA und McKINLEY (1972) bei Ratten. Bei Hamstern beobachteten COLLINS und WILLIAMS (1972) nach oraler Applikation von 2,4,5-T das Fehlen der Augenlider und Exencephalien. YASUDA und MAEDA (1972) verabreichten an Wistar-Ratten 4-Chloro-2-methylphenoxyessigsäureäthylester (MCPPE) und fanden bei den Nachkommen Gaumenspalten, Ventrikelsep-

tumdefekte und Nierenanomalien. Unter den Harnstoffderivaten, zu denen auch Monolinuron und Buturon gehören, konnte für Äthylenthioharnstoff eine teratogene Wirkung nachgewiesen werden. Nach oraler Gabe von mehr als 10 mg/kg an Ratten vom 6. - 15. Tag der Trächtigkeit erhöhte sich die Anzahl der aufgetretenen Gehirnmißbildungen, Spina bifida und short- oder kinky-tail signifikant (KHERRA, 1973).

Ein Vergleich dieser vorliegenden Ergebnisse zeigt, daß trotz der unterschiedlichen Versuchsbedingungen bei mehreren Tierarten und Zuchtstämmen drei Mißbildungen im Vordergrund standen. Am häufigsten wurden Spaltbildungen des Gaumens gefunden. Danach folgten Exencephalien und Rippenmißbildungen. Dieses Phänomen konnte auch bei den Untersuchungen zur Teratogenität der beiden Harnstoffherbizide Monolinuron und Buturon beobachtet werden. Aus dieser Tatsache lassen sich mehrere Schlüsse ziehen:

Alle potentiell teratogenen Herbizide lösen ungeachtet der chemischen Struktur der Substanz, der Applikationsart und -zeit und unabhängig von Art und Zuchtstamm des Versuchstiers Gaumenspalten, Exencephalien und Rippenmißbildungen aus. Die prozentuale Verteilung zwischen diesen drei Fehlbildungen schwankt dagegen in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen und dem verwendeten Tiermaterial. Die größte Sensibilität für die Auslösung von Gaumenspalten haben Mäuse und Ratten, Exencephalien wurden vorwiegend beim Hamster und bei der Ratte und die Rippenmißbildungen verteilten sich gleichmäßig auf alle drei Tierarten. Der

für die Versuche mit Monolinuron und Buturon verwendete NMRI-Mäusestamm hat sich in vielen vorangegangenen Versuchen mit den unterschiedlichsten Substanzen als sehr sensibel gegenüber Teratogenen erwiesen. Dabei standen stets die Mißbildungen des knöchernen Gaumens im Vordergrund (ROLL, 1968, 1969, 1971 ; MATTHIASCH, 1973). Alle anderen beobachteten Fehlbildungen traten nur vereinzelt auf. Um zu prüfen, ob Monolinuron und Buturon, die sich als Teratogene erwiesen haben, auch mutagen wirken, wurden die beiden Herbizide mit Hilfe des Tests auf dominante Letalfaktoren und der Chromosomenaberrationen in den Knochenmarkzellen untersucht. Der Dominant-Letal-Test mit Mäusen ist zwar materiall relativ aufwendig, denn eine genügend große Zahl behandelter Männchen muß sieben Wochen lang virginellen, unbehandelten Weibchen verpaart werden. Er ermöglicht jedoch die Analyse von Mutationsereignissen an Chromosomen der Säugerkeimzellen über den gesamten Spermiogenesecyclus (RÖHRBORN, 1970). Aus dem prä- und postimplantativen Verlust kann man mit Einschränkung auf die Mutagenität einer Substanz schließen, denn ein vermehrter Verlust von Blastocysten und Resorptionen bei den Weibchen nach Behandlung der männlichen Tiere beweist noch nicht die mutagene Wirkung eines Stoffes, solange der erzeugte Effekt möglicherweise nur Letalität, nicht aber Mutagenität bedeutet (FISCHER et al., 1970). Der präimplantative Verlust stellt nur einen Indikator für die Möglichkeit der Induktion von dominanten Letalfaktoren dar, denn auch Superovulation bei den Weibchen oder Inaktivierung der Spermien nach

Behandlung der Männchen führt zu einer Erhöhung der Letalität (RÖHRBORN, 1970). Genetische Effekte, die auf Brüchen in den Chromosomen beruhen, bleiben bis zur nächsten Zellteilung unerkannt. Brüche, die in den postmeiotischen Spermatiden induziert werden, erzeugen meist normal funktionierende Spermien. Wenn jedoch einfache Chromosomenbrüche in den Spermatocyten oder Spermatogonien auftreten, sind die sich daraus entwickelnden Spermien meist steril. Im Allgemeinen ist die Empfindlichkeit der Mäuse für Mutagene auf die postmeiotischen Stadien der Spermatogenese beschränkt (EPSTEIN und SHAFNER, 1968 ; BATEMAN, 1973). Es gibt aber auch Substanzen, die auf die postmeiotische Phase keinen mutagenen Effekt haben, sondern nur bei den Spermatogonien und den frühen Spermatocyten. Dazu gehört z.B. Mitomycin C (EHLING, 1971). Bei multiplen Chromosomenschäden ist die Zellteilung in jedem Fall abnorm und solche Blastocysten werden auch nicht implantiert. Zellen mit einem einzigen Bruch erreichen bei annähernd normalem Wachstum die Implantation, gehen dann jedoch zugrunde und bleiben als Deciduomata sichtbar. Dominante Letalmutationen können nicht über Generationen weitergegeben werden, da sie noch vor oder kurz nach der Implantation eliminiert werden. Jedoch induzieren Substanzen, die dominante Letalmutationen hervorrufen, auch andere Typen von Mutationen, so daß sie gute Indikatoren für mutagene Wirkung sind (RÖHRBORN, 1970 ; BATEMAN, 1973). "In ihrer Gesamtheit beruhen dominante Letalfaktoren wohl mehrheitlich auf Mutationen des Chromoso-

menbaus. Ob und in welchem Maß Genmutationen dominante Letalfaktoren bewirken können, ist nach den bisherigen Erfahrungen noch nicht zu entscheiden. Über den zellulären und entwicklungsphysiologischen Zustand der absterbenden Zygoten ist nur wenig bekannt. SONNENBLICK konnte zeigen, daß in den letalen Embryonen zahlreiche gestörte Mitosen mit abgesprengten Chromosomen und Chromosomenteilchen vorkommen und daß sich an Stelle von differenzierten Geweben nur syncytiale Massen vorfinden, in denen eine "freie" Kernteilung noch weiterläuft". Diese von HADORN 1955 gegebenen Erklärungen haben auch heute noch Gültigkeit, da man auf diesem Gebiet noch nicht zu neuen Erkenntnissen gekommen ist.

Für viele Herbizide ist eine genetische Wirkung nachgewiesen worden. Einige wirken als Mitosegifte oder hemmen die Synthese der m-RNS durch Eingriff in die Transskription. Andere, wie z.B. Chlorcholinchlorid, synthetisieren in der Pflanze Derivate mit stark alkylierenden Eigenschaften (IVES und BLACKMAN, 1949 ; MORELAND und HILL, 1959 ; KEITT, 1967 ; MARTIN, 1967). Für die meisten Pflanzenschutzmittel, so auch für die Harnstoffherbizide, sind die Wirkungsmechanismen unbekannt, die zu genetischen Effekten führen. Nur von Dichlorphenylmethoxymethylharnstoff (= Linuron) ist bekannt, daß es neben einer zellwandschädigenden Wirkung an den Chromosomen sogenannte sticky effects hervorruft (GRANT, 1973). Nach der Behandlung von Gerste mit Chlorphenylmethylharnstoff (= Monuron) konnten Chro-

mosomenaberrationen beobachtet werden (EL-SADEK, 1972). Für den Test auf dominante Letalfaktoren mit Monolinuron und Buturon wurden zwei Kontrollversuche durchgeführt. Die durchschnittliche Befruchtungsquote betrug im ersten Versuch 77,5 % und im zweiten 89,5 %. Dieser Unterschied war vermutlich jahreszeitlich bedingt. Die präimplantativen Verluste lagen bei 12,2 % bzw. 10,5 % und die postimplantativen Verluste bei 8,7 bzw. 9,6 %. Es wurden fast nur frühe Resorptionen gefunden. Die orale Gabe von Monolinuron verminderte die Fertilität der NMRI-Männchen während der Dauer des gesamten Spermiogenesecyclus. Während nach 250 mg/kg erst die frühen Spermatiden und die Spermatozyten geschädigt wurden, wurde nach Gabe von 1000 mg/kg auch die Fertilität der Spermien und Spermatiden vermindert. Die frühen Spermatogonien waren relativ unempfindlich gegen die Substanz, die späten Spermatogonien dagegen sehr empfindlich, so daß die Befruchtungsquote auf den niedrigsten Wert des Versuchs absank (41,7 % bzw. 51,7 % gegenüber 77,5 % bei den Kontrolltieren). Die orale Applikation von 200 mg Buturon/kg dagegen beeinflusste den Fertilitätsindex zu keinem Zeitpunkt der Spermiogenese und 350 mg Buturon/kg führte nur in der 1. Verpaarungswoche zu einer signifikanten Erniedrigung der Befruchtungsquote. Alle jüngeren Stadien der Spermiogenese blieben unbeeinflusst. Der präimplantative Verlust stieg nach der Verabreichung von 250 mg Monolinuron/kg in der ersten Verpaarungswoche signifikant an auf 21,1 % gegenüber 12,2 % im Kon-

trollversuch, im übrigen Spermiogenesecyclus konnten keine Veränderungen beobachtet werden. Die Gabe von 1000 mg Monolinuron/kg erhöhte die Zahl der abgestorbenen Blastocysten in der 1. - 4. Verpaarungswoche, alle übrigen Stadien wurden von der Substanz nicht geschädigt. Nach der Applikation von 200 mg Buturon/kg wurde ebenfalls in der ersten Verpaarungswoche ein signifikanter Anstieg des präimplantativen Verlustes auf 17,2 % registriert. Von der höheren Dosis (350 mg Buturon/kg) wurden nicht nur die Spermien (1. Woche), sondern auch die späten Spermatiden (2. Woche) geschädigt. Von der 3. Verpaarungswoche an lagen die präimplantativen Verluste wieder im Kontrollbereich.

Die postimplantativen Verluste waren sowohl nach der Gabe von 250 mg als auch nach 1000 mg Monolinuron/kg in den . Verpaarungswochen signifikant erhöht (13,4 % bzw. 14,2 %). Hauptsächlich wurden frühe Resorptionen gefunden, jedoch betrug das Verhältnis späte Resorptionen : tote Feten nach 250 mg Monolinuron 1 : 1 und nach 1000 mg Monolinuron 1 : 1,5. Von der 2. Verpaarungswoche an waren die Werte wieder normal. Nach der Verabreichung von 200 mg und 350 mg Buturon/kg konnte in beiden Versuchsgruppen nur eine geringe Verschiebung des Verhältnisses frühe Resorptionen : späte Resorptionen : tote Feten in Richtung der späten Resorptionen und toten Feten beobachtet werden. Der Prozentsatz aller toten Implantate blieb jedoch gleich und unterschied sich in beiden Versuchen zu keinem Zeitpunkt der Spermiogenese von den Kontrollwerten.

aus den prä- und postimplantativen Verlusten errechneten sich die Gesamtverluste. Sie stellen die Differenzen zwischen der Anzahl ovulierter Oocyten und der Anzahl lebender Feten dar. Nach der Applikation von 250 mg Monolinuron/kg an die männlichen Tiere konnte ein Anstieg des Gesamtverlustes aller Zygoten bei den Leichen in der ersten Verpaarungswoche um 9,9 % auf 31,7 % gegenüber dem Kontrollwert von 21,8 % in diesem Zeitraum bzw. um 10,4 % gegenüber dem durchschnittlichen Gesamtverlust aller Kontrolltiere beobachtet werden. Nach der Gabe von 1000 mg/kg stieg nicht nur der Gesamtverlust in der ersten Verpaarungswoche signifikant auf 29,0 % gegenüber dem Kontrollwert, sondern auch in der 3. Woche des Spermiogenesezyklus war dieser Wert um 7,7 % gegenüber dem durchschnittlichen Gesamtverlust der Kontrolltiere erhöht. Daraus ergibt sich, daß Monolinuron hauptsächlich Letaleffekte in den Spermien bewirkte, mit steigender Konzentration aber auch die frühen Spermatiden schädigte. Die Effekte waren so schwerwiegend, daß die Blastocysten nicht die Nidation erreichten, denn der Hauptanteil der erhöhten Gesamtverluste entfiel auf die präimplantativen Entwicklungsstadien. Etwas andere Ergebnisse wurden nach der Verabreichung von Buturon an die männlichen Tiere beobachtet. Die Gabe von 200 mg/kg führte in der ersten Verpaarungswoche zu keiner Erhöhung des Gesamtverlustes, wenn der Wert ausschließlich mit dem der Kontrolltiere des gleichen Verpaarungsabschnittes verglichen wurde. Lediglich gegenüber dem durchschnittlichen Wert aller Kontrollgruppen von 16,5 % ließ sich eine Stei-

gerung des Gesamtverlustes statistisch sichern. Da sich nach Verabreichung von 350 mg Buturon/kg ein solcher Effekt in der ersten Verpaarungswoche nicht feststellen ließ, scheint dieser Befund zufallsbedingt zu sein. Dagegen konnte in der zweiten Verpaarungswoche nach Gabe von 350 mg/kg eine sehr starke Erhöhung des Gesamtverlustes beobachtet werden. Er stieg um 13,7 % auf 32,5 % gegenüber dem Wert der Kontrolltiere des gleichen Verpaarungszeitraums und um 16,0 % im Vergleich zum Durchschnittswert aller Kontrolltiere. Dieser Befund zeigt, daß Buturon im Gegensatz zu Monolinuron die späten Spermatiden, nicht aber die Histogenesestadien der Spermien und der frühen Spermatiden schädigt. Allerdings waren von dieser Schädigung durch Buturon ebenfalls die präimplantativen Entwicklungsstufen betroffen. Ob es sich bei diesen Effekten um Mutationen handelt oder ob lediglich Sterilität der Spermien bzw. der Spermatiden bewirkt wird, ist nicht eindeutig zu entscheiden.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen zur Teratogenität und Mutagenität mit Hilfe des Dominant-Letal-Tests erfordern cytogenetische Methoden weniger Tiere und die Präparate liegen schon nach wenigen Stunden oder Tagen nach der Substanzapplikation vor. Da jede Spezies auf ein Mutagen quantitativ anders reagiert, ist für eine Gesamtbeurteilung der Mutagenität einer Substanz die Untersuchung mehrerer Objekte mit verschiedenen Tests erforderlich, denn die Effekte hängen vom Zellcyclus und dem pharmakokinetischen Verhalten des Stoffes im Tier ab (FROHBURG, 1973 ;

FROHBERG und BAUER, 1973). Für eine cytogenetische Untersuchung sollte eine Tierart mit gut differenzierbaren Chromosomen gewählt werden. So bietet sich die Ratte mit 42 Chromosomen unterschiedlicher Größe und Gestalt und der Chinesische Hamster mit 40 sehr gut unterscheidbaren Chromosomen an. Die Maus ist wegen ihrer 40 sehr kleinen und schwer unterscheidbaren Chromosomen nur beschränkt brauchbar. Für eine sichere Beurteilung ist eine sehr gute Ausbreitung der Metaphasechromosomen auf dem Objektträger nötig. Bei der schnellen Aufbringung der Zellsuspension findet man gelegentlich sowohl hypo- als auch hyperdiploide Metaphasen. Überzählige Chromosomen stammen von benachbarten Zellen und fehlende Chromosomen können präparative Verluste sein, die nicht Zeichen von mitotischem non-disjunction sein müssen (FORD und WOOLLAM, 1963 ; DATTA et al., 1970 ; SCHLEIERMACHER, 1971). Eine Schwierigkeit bereitet die Interpretation der achromatischen Läsionen, der sog. "gaps". Um welche Art von Störungen es sich bei den "gaps" tatsächlich handelt, ist noch weitgehend unbekannt. Sie könnten lokale Entspiralisierung oder Materialverluste (DNS-Verluste) darstellen. Äußerlich haben sie oft Ähnlichkeit mit Chromatidbrüchen und werden vielfach auch als solche gewertet, obwohl sie keine echte Diskontinuität darstellen und manchmal auch dünne Chromatinverbindungen erkennbar sind. Man könnte sie jedoch als "aktivierte Zustände" bestimmter Chromosomenregionen ansehen, die unter bestimmter Bedingungen in komplette Brüche umgewandelt werden könnten, normalerweise

aber durch rasche Reparatur innerhalb eines Zellzyklus ohne genetische Konsequenz bleiben. Das Verteilungsmuster der "gaps" ähnelt jedenfalls in den meisten Fällen chemischer Mutagenese dem der Brüche: die Dosis-Effekt- und die Zeit-Effekt-Beziehung ist fast immer nahezu linear. Aus diesem Grund kann man ihr Auftreten durchaus als Indikator oder Primäreffekt einer mutagenen Wirkung ansehen (MARQUARDT, 1950 ; RIEGER und MICHAELIS, 1967 ; GEBHART, 1971). SCHEID und TRAUT (1970, 1971) haben mit UV-mikroskopischen und elektronenoptischen Methoden zeigen können, daß "gaps" bei *Vicia faba* eine echte morphologische Veränderung des Chromosoms darstellen. GEBHART (1971) stellte fest, daß eine Dosis-Effekt-Beziehung zwischen der Anzahl der "gaps" und der Konzentration von Myleran und Trenimon in Humanblutkulturen bestand. Das Verteilungsmuster der "gaps" zeigte in seiner Spezifität große Ähnlichkeit mit dem der Brüche. Daraus könnte man ableiten, daß achromatische Läsionen eine ebenso spezifische Reaktion der Chromosomen auf die Einwirkung von Mutagenen darstellen wie die Brüche. Zur Klärung der genetischen Relevanz müssen jedoch noch Untersuchungen über die Feinstruktur der "gaps" und kreuzungsgenetische Untersuchungen an geeigneten Objekten durchgeführt werden (OBE, 1967 ; GEBHART, 1971, OBE, 1972). Die "echten" Chromosomenbrüche werden grundsätzlich als Mutationen angesehen, d.h. alle chromosomenbrechenden Substanzen sind mutagen. Jede toxische Substanz wird allerdings ab einer bestimmten Konzentration die Chromosomen zerstören, ohne im ei-

gentlichen Sinn mutagen zu sein. Vielleicht ist das ein sekundärer Effekt durch Aktivierung nukleolytischer Enzyme (FISHBEIN et al., 1970).

Die einmalige orale Applikation von 400 mg bzw. 800 mg Monolinuron/kg beeinflusste den Mitoseindex der Knochenmarkszellen nicht. Die zweimalige Gabe im Abstand von 24 Stunden senkte den Mitoseindex 6 und 16 Stunden nach der letzten Substanzgabe signifikant gegenüber dem Kontrollwert. Nach 800 mg/kg war der mitostatische Effekt besonders deutlich. Die erniedrigten Werte wurden über 24 Stunden, d.h. über die Dauer des Zellzyklus im Knochenmark (KESSELIAS et al., 1967), beibehalten und erst nach 48 Stunden wurde wieder ein Mitoseindex ermittelt, der dem Kontrollwert entsprach. Die einmalige Verabreichung von 300 bzw. 600 mg Buturon/kg beeinflusste den Mitoseindex nicht. Nach zweimaliger Gabe von 300 mg/kg im Abstand von 24 Stunden konnten 6 und 16 Stunden nach der letzten Substanzgabe Mitoseindices beobachtet werden, die unterhalb des Kontrollwertes lagen. Nach 24 Stunden waren wieder Normalwerte erreicht. Einen stärkeren mitostatischen Effekt hatte die zweimalige Applikation von 600 mg/kg. Der signifikant erniedrigte Mitoseindex wurde noch nach 24 Stunden gefunden und erst nach 48 Stunden war wieder das Kontrollniveau erreicht. Während sich der Mitoseindex in Abhängigkeit von der applizierten Dosis, dem Applikationsintervall und der Zeit nach der letzten Gabe der Substanz änderte, konnte in den Metaphasen sowohl nach der Verabreichung von Monolinuron als auch von Buturon kein Anstieg der Anzahl aberranter

Chromosomen beobachtet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die beiden Harnstoffherbizide Monolinuron und Buturon für Mäuse des INRI-Stammes eine teratogene Wirkung haben. Diese Tatsache äußerte sich durch eine größere Häufigkeit von Gaumenspalten, Exencephalien, Exenterien und Rippenmißbildungen. Gleichzeitig konnte in Aufzuchtversuchen festgestellt werden, daß beide Substanzen sowohl prä- als auch postnatale Letaleffekte induzierten, was zu vermehrten Resorptionen und toten Feten während der Gravidität und zu einer erhöhten Mortalität der Jungtiere während der Laktationsperiode führte. Der Test auf dominante Letalfaktoren zeigte für Monolinuron in den beiden ersten und für Buturon in den ersten drei Verpaarungswochen eine Erhöhung der Letalität. Das bedeutet, daß vorwiegend die Spermien und Spermatiden durch diese beiden Substanzen geschädigt werden. Der Nachweis eines sichtbaren genetischen Defekts an den Chromosomen gelang nicht und der Einfluß beider Stoffe auf den Mitoseindex im Knochenmark ist als primärer toxischer Effekt an den Erythrocyten zu deuten.

Bei der Betrachtung der vorliegenden Versuchsergebnisse stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen und nach der Abschätzung des Risikos bei der Anwendung dieser Substanzen. Ein Testsystem allein scheint nicht geeignet, Auskunft über die Wirksamkeit eines Agens beim Menschen zu geben (GEBHART, 1969 ; POHL, 1971). Nach den derzeitigen Erfahrungen ist neben den Untersuchungen zur Teratogenität der Test auf

dominante Letalfaktoren und die cytogenetische Untersuchung des Knochenmarks in vivo am praktikabelsten. Die Befunde an meiotischen Teilungen in Testes- bzw. Cvarmutarial lassen nach dem gegenwärtigen Stand keine Rückschlüsse auf die Mutagenität einer Substanz zu. Die z.Z. routinemäßig verwendeten cytogenetischen Methoden eignen sich aber auch nur zum Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen, nicht jedoch zur sicheren Erfassung von Genmutationen. Also ist ein negativer Chromosomenbefund noch kein Beweis, daß nicht doch Genmutationen stattgefunden haben (SCHROEDER, 1970). Aus diesen Überlegungen folgt, daß Substanzen, die in mehreren in vivo-Tests an möglichst vielen Labortierspezies teratogene bzw. mutagene Wirkungen entfalten, mit hoher Wahrscheinlichkeit solche Ereignisse auch beim Menschen induzieren (SCHMID, 1973). Die Untersuchung der Herbizide auf ihre Schädlichkeit für den Säugetierorganismus und die Abschätzung des Risikos für die menschliche Ernährung sind von großer Wichtigkeit, denn die Höhe der Rückstände von Herbiziden, die unmittelbar durch Spritzung der Pflanzen und des Bodens oder mittelbar durch die Nahrungskette in den Organismus gelangen, ist nur schwer vorauszuberechnen oder abzuschätzen (WEGLER und EUE, 1970 ; EER und ROLL, 1972). MÜLLER (1972) fand im Kohlrabi (Rindenzone, Leitbündel und Blätter) 1,00 - 2,15 mg/kg und im Blumenkohl 0,97 - 24,70 mg/kg Rückstände des Wachstumsregulators Chlorcholinchlorid (CCC). ADLER (1972) verfütterte 3,5-Dichlor-N-benzamid (Grasherbizid "Kerb") an Milchkühe und

legende Hennen. In der Milch bzw. in den Eiern konnten Rückstände in der Höhe von 0,01 - 0,1 mg/kg nachgewiesen werden. In den Geweben lagen die Werte etwas höher, eine ausgesprochene Anreicherung der Substanz konnte jedoch nicht beobachtet werden. Le ROY BJERKE et al. (1972) untersuchten Milch und Rahm auf Rückstände der Herbizide 2,4-D, 2,4,5-T, 2-(2,4,5-Trichlorphenoxy)-propionsäure bzw. 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure. Nach Verabreichung von 10 - 1000 ppm dieser Substanzen an Kühe fanden sie bis zu 0,4 ppm in Milch und Rahm.

In der Höchstmengenverordnung Pflanzenschutz in der Neufassung vom 5. 6. 1973 (BGBl. I, S. 537) heißt es: "Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, in oder auf denen Reste der in Anlage I aufgeführten Stoffe als Folge einer unmitttelbaren oder mittelbaren Anwendung solcher Stoffe über die dort für die Lebensmittel jeweils festgesetzten Höchstmengen hinaus vorhanden sind, dürfen nicht in den Verkehr gebracht werden". Monolinuron-Rückstände auf Spinat sind bis zu 0,3 ppm, auf anderen Gemüsen bis zu 0,2 ppm, Buturon-Rückstände auf Getreide und Obst bis zu 0,1 ppm, auf sonstigen Lebensmitteln nur bis zu 0,05 ppm zugelassen.

Nimmt man z.B. nach den vorliegenden Untersuchungen für Monolinuron einen teratogenen Schwellenwert von 100 mg/kg Tiergewicht an, so müßte eine 35 g schwere Maus ca. 17 kg Gemüse mit einem Rückstandsgehalt von 0,2 ppm fressen, um die Toleranzgrenze zu überschreiten. Diese Größenord-

nung zeigt, daß beide Substanzen für den Menschen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit keine Gefahr darstellen.

Wenig bearbeitet wurde dagegen bisher das Problem der gleichzeitigen Einwirkung mehrerer Stoffe. Für die Beurteilung der tatsächlichen Risiken ist die Erkennung von Synergismen ebenso wichtig wie das Auffinden teratogener, mutagener und cancerogener Wirkungen einzelner Substanzen. Es ist durchaus denkbar, daß sich auch vereinzelt antagonistische Wirkungen entfalten. So ist z.B. lange bekannt, daß Strahlenschädigungen durch Cysteingabe reduziert werden können. MATTHIASCHK (1973) konnte ein durch das Fungizid Thiram (TMTD) induziertes, schweres Mißbildungssyndrom bei NMRI-Mäusen durch simultane Cysteininjektion sowohl quantitativ als auch qualitativ beträchtlich vermindern.

Literaturverzeichnis

- ADLER, I.L. : Rückstandsuntersuchungen an Milchkühen und legenden Hennen durch Verfütterung von 3,5-Dichlor-N-benzamid.
J. Agr. Food Chem. 20, 1233-1235 (1972).
- AUDUS, L.J. : The physiology and biochemistry of herbicides.
Academic Press, London - New York (1964).
- Auswertungs- und Informationsdienst: Prüfung, Zulassung und Anwendung von Pflanzenschutzmitteln.
Herausgeber AID Bonn-Bad Godesberg, Nr.341.
- BADR, F.M. ; BADR, R.S. : The somatic chromosomes of a wild population of rats.
Chromosoma 30, 465 (1970).
- BÄR, F. ; ROLL, R. : Belastung des Menschen durch Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel.
In SCHULTZE, H. : Umweltreport, S. 305.
Umschau-Verlag, Frankfurt am Main (1972).
- BAO, T.v. ; SZABO, I. ; RUZIESKA, P. ; CZEIZEL, A. :
Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication.
Humangenetik 24, 33-57 (1974).
- BATEMAN, A.J. : The partition of dominant lethals in the mouse between unimplanted eggs and deciduomata.
Heredity 12, 467-475 (1958).
- BATEMAN, A.J. : The dominant lethal assay in the mouse.
Agents and Actions 3, 73-76 (1973).
- BAUER, A. ; FROHBERG, H. : Cytogenetic techniques. International workshop on mutagenicity testing.
Workshop Manual, Zürich (1972).
- BAUER, K.H. : Das Krebsproblem, S. 390. Springer (1963).

- BOEHRINGER Sohn, C.H., Ingelheim : Prüfung der Substanz
2,4,5-T auf Teratogenität an Mäusen (1970).
- BOEHRINGER Sohn, C.H., Ingelheim : Prüfung der Substanz
2,4,5-T auf Teratogenität an Ratten (1970).
- BOEHRINGER Sohn, C.H., Ingelheim : Prüfung der Substanz
2,4,5-T (dioxinfreie Charge). (1971).
- BUCHHOLTZ, K.P. : Weed Soc. of American Abstracts 2, 23
(1958).
- BUSELMAIER, W.G. ; RÖHRBORN, G. ; PROPPING, P. : Compara-
tive investigations on the mutagenicity of
pesticides in mammalian test systems.
Ref. in : Mut. Res. 21, 25 (1973).
- BUU- HOI, N.P. ; SAINT-RUF, G. ; BIGOT, P. ; MANGANE, M.:
Preparations, properties and identification
of dioxin in the pyrolyzates of defolians
based on 2,4,5-T and its esters and in
contaminated plants.
C.R. Acad. Sci. Ser. 273, 708-711 (1971).
- CARLISLE, D.B. : Cyclocel (CCC).
New Scientist 40, 110 (1968).
- COLLINS, T.F. ; WILLIAMS, C.H. : Teratogenic studies with
2,4,5-T and 2,4-D in the hamster.
Bull. Environ. Cont. Toxicol. 6, 559 (1971).
- COULSTON, F. : Teratogenese, Mutagenese und Karzinogenese
in moderner Betrachtung der Nutzen-Risiko-
Abschätzung. In : Probleme der Beurteilung
zytotoxischer Effekte von Umweltchemikalien.
Forum für Wissenschaft, Wirtschaft und Poli-
tik 5, 4-8 (1974).
- COURTNEY, K.D. ; GAYLOR, D.W. ; HOGAN, M.D. : Teratogenic
evaluation of 2,4,5-T.
Science 168, 864 (1970).

- COURTNEY, K.D. ; MOORE, J.A. : Teratology studies with 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-Tetrachlorodobenzo-p-dioxin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 20, 396-403 (1971).
- CRAFTS, A.S. : Hilgardia 26, 287 (1956).
- CRAFTS, A.S. : The physiology and biochemistry of herbicides. In : AUDUS, L.J., Academic Press, London - New York (1964).
- CRAFTS, A.S. ; ROBBINS, W.W. : Weed control. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York (1965).
- CRAMER, H.H. : Pflanzenschutz und Welternnte. Pflanzenschutznachrichten "Bayer" 2, 1967.
- GERIZEL, A. ; BAO, T.v. ; SCAPO, I. ; RUZICKA, F. : Human chromosome aberrations in acute organic phosphorus acid ester intoxication. Ref. in : Mut. Res. 21, 26 (1973).
- DÄVRING, L. ; SUNNER, M. : Cytogenetic effects of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid on oogenesis and early embryogenesis in Drosophila. Hereditas 68, 115-122 (1971).
- DATTA, P.K. ; FRIGGER, H. ; SCHLEIERMACHER, E. : The effect of chemical mutagens on the mitotic chromosomes of the mouse in vivo. In : VOGEL, F. und RÖHRBORN, G.: Chemical mutagenesis in mammals and man. S. 194-213. Springer-Verlag (1970).
- DAWSON, A.B. : A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red. Stain Technol. 1, 123-124 (1926).
- DEGENHARDT, K.H. : Teratologische Probleme der Umweltverschmutzung. In : SCHULTZE, H. : Umweltreport, S. 290. Umschau-Verlag (1972).
- DOUGHERTY, W.H. ; COULSTON, F. ; GOLBERG, L. : Non-teratogenicity of 2,4,5-T in monkeys. Ref. in : Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 442 (1973).

- DRUCKREY, H. ; RAABE, S. : Organspezifische Chemotherapie des Krebses.
Klin. Wschr. 30, 882 (1952).
- EGOZCUE, J. : Effect of LSD-25 on mitotic and meiotic chromosomes of mice and monkeys.
Humangenetik 8, 86 (1969).
- EHLING, U.H. : Comparison of radiation- and chemically-induced dominant lethal mutations in male mice.
Mut. Res. 11, 35-44 (1971).
- EHLING, U.H. ; CUMMING, R.B. ; MALLING, H.V. : Induction of dominant lethal mutations by alkylating agents in male mice.
Mut. Res. 5, 417 (1968).
- EICHHOLZ, F. : Die toxische Gesamtsituation auf dem Gebiet der menschlichen Ernährung.
Springer-Verlag (1956).
- EICHHOLZ, F. : Chemikalien in den Nahrungsmitteln - Eine Bedrohung unserer Gesundheit.
Körner-Verlag, Stuttgart (1957).
- EL-SADEK, L.M. : Comparison of cytogenetic activity of compounds on molar basis.
Alexandria J. Agr. Res. 20, 283-288 (1972).
- EMERSON, J.L. ; THOMPSON, D.J. ; GERBIG, C.G. : Teratogenic study of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid in the rat.
Ref. in : Toxicol. Appl. Pharmacol. 17, 317 (1970).
- EMERSON, J.L. ; THOMPSON, D.J. ; STREIBING, R. ; GERBIG, C.G. ; ROBINSON, V.B. : Teratogenic studies on 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid in the rat and rabbit.
Fd. Cosmet. Toxicol. 9, 395-404 (1971).
- EPSTEIN, S.S. ; SHAFNER, H. : Chemical mutagens in the human environment.
Nature 219, 385-387 (1968).

- EPSTEIN, S.S. ; ARNOLD, E. ; ANDREA, J. ; BASS, W. and
BISHOP, Y. : Detection of chemical mutagens
by the dominant lethal assay in the mouse.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 288-328 (1972).
- FANG, S.C. ; FALLIN, E. ; MONTGOMERY, M.L. ; FREED, V.H. :
The metabolism and distribution of 2,4,5-T
in female rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 24, 555-563 (1973).
- FENNELLY, J.J. ; GALEAGHER, J.Z. ; CARROL, R.J. : Para-
quat poisoning in a pregnant woman.
Brit. med. J. 3, 722 (1968).
- FINNEY, D.J. : Probit analysis.
Cambridge University Press (1971).
- FISHBEIN, L. ; FLAMM, W.G. ; FALK, H.L. : Chemical muta-
gens. Environmental effects on biological
systems, S. 93-95.
Academic Press, New York (1970).
- FLETCHER, K. : Paraquat and sterility of hen's eggs.
Nature 215, 1407-1408 (1967).
- FOERST, W. : Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie.
Urban und Schwarzenberg-Verlag, S. 146-159
(1964).
- FORD, E.H.R. ; WOOLLAM, D.H.M. : A study of the mitotic
chromosomes of mice of the strong A line.
Exptl. Cell Res. 32, 320-326 (1963).
- FROHBERG, H. : Critique of in vivo cytogenetic test system.
Agents and Actions 3, 119-123 (1973).
- FROHBERG, H. ; OETTEL, H. : Method of testing for terato-
genicity in mice.
Industr. Med. Surg. 35, 113-120 (1966).
- FROHBERG, H. ; BAUER, A. : Mutagenicity trials under toxicological aspects.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 23, 230 (1973).

- GEBHART, E. : Zur Gefährdung des menschlichen Erbgutes durch Chemikalien.
Zschr. Allgemeinmed. "Der Landarzt" 34,
1622-1628 (1969).
- GEBHART, E. : Experimentelle Beiträge zum Problem der lokalen Achromasien (Gaps).
Humangenetik 13, 98-107 (1971).
- GEBHART, E. ; WISSMÜLLER, H.F. : Investigations on the effect of phenylbutazone on chromosomes and mitosis in the bone marrow of rats.
Mut. Res. 17, 283-286 (1973).
- GENEROSO, W.M. : Chemical induction of dominant lethals in female mice.
Genetics 61, 461 (1969).
- GIBSON, J.E. : Teratology studies in mice with 2-sec-Bu-tyl-4,6-dinitrophenol (Dinoseb).
Fd. Cosmet. Toxicol. 11, 31-43 (1973).
- GIBSON, J.E. ; RAO, K.S. : Disposition of 2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenol (Dinoseb) in pregnant mice.
Fd. Cosmet. Toxicol. 11, 45-52 (1973).
- GOULD, C.S. ; BRIGGS, R.A. ; WOLF, D.E. : Three years results with calcium cyanamid as a pre-emergence treatment on corn.
Proc. Northeast. States Weeds control Conf., S. 205 (1950).
- GRAHAM, F. : Seit dem stummen Frühling.
Biederstein- Verlag, S. 277-289 (1971).
- GRANT, W.F. : Cytological effects of environmental mutagens.
Ref. in : Mut. Res. 21, 26 (1973).
- GREEN, S. ; SAURO, F.M. ; LEGATOR, M.S. : Cytogenetic effects of hycanthone in the rat.
Mut. Res. 17, 239-244 (1973).

- GRÜNEBERG, H. : Genetical studies on the skeleton of the mouse: Undulated and its modifiers.
J. Genet. 50, 142-173 (1950c).
- GRÜNEBERG, H. : The development of undulated.
J. Genet. 52, 441-455 (1954c).
- HADORN, E. : Letalfaktoren.
Thieme-Verlag, Stuttgart. S. 100, 135-251 (1955).
- HERHA, J. ; OBE, G. : Chromosomal damage in chronical users of Cannabis. In vivo investigation with two-day leucocyte cultures.
Pharmakopsychat. 7, 328-337 (1974).
- HESS, R. : Induced dominant lethals in female mice.
Agents and Actions 3, 116 (1973).
- HINKLE, D.K. : Teratogenic effects of Pentachlorophenol in the golden syrian hamster.
Ref. in : Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 455 (1973).
- HOLDEN, H.E. ; RAY, V.A. ; WAHRENBURG, M.G. ; ZELENSKI, J.:
Mutagenicity studies with 6-Mercaptopurin.
Cytogenetic activity in vivo.
Mut. Res. 20, 257-263 (1973).
- IVES, G.W. ; BLACKMAN, G.E. : Symp. Exp. Biol. III.
S. 106 (1949).
- JENSEN, M.K. : Phenylbutazone, Chloramphenicol and the mammalian chromosomes.
Humangenetik 17, 61 (1972).
- JUSKIEWICZ, T. ; RAKALSKA, Z. ; DZIERZAWSKI, A. : Effect embryopathique du chlorure de chlorocholine (CCC) chez le hamster doré.
Eur. J. Toxicol. 3, 265 (1970).
- KALTER, H. : Interlay of intrinsic and extrinsic factors.
In : WILSON and WALKANY: Teratology principles and techniques, S. 57-80.
University of Chicago Press (1964).

- KEITT, G.W. : *Physiol. Plantarum* 20, 1076 (1967).
- KESSE-ELIAS, M. ; HARRISS, E.B. ; GYFTAKI, E. : In vitro study of DNA-synthesis time and cell cycle time in erythrocyte precursors.
Acta haemat. (Basel) 38, 170 (1967).
- KHERA, K.S. ; WHITTA, L.L. : Embryopathic effects of diaquat and paraquat in the white rat.
Ind. Med. Surg. 37, 553 (1968).
- KHERA, K.S. ; MCKINLEY, W.P. : Pre- and postnatale studies on 2,4,5-T , 2,4-D and their derivatives in rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 22, 14 (1972).
- KHERA, K.S. : Ethylenethiourea - Teratogenicity study in rats and rabbits.
Teratology 7, 243-252 (1973).
- KIMBROUGH, R.D. : Toxicity of chlorinated hydrocarbons and related compounds.
Arch. Environment. Health 25, 125-131 (1972).
- KLIMMER, O.R. : Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel.
Hundt-Verlag (1964).
- KOLBERG, J. ; HELGELAND, K.J. : The herbicide 2,4-D. The effect on L-cells.
Acta pharmac. tox. 29, 81 (1971).
- KORSMO, E. : *Meld. Norg. Landbr. Hoisk.* 12, 305 (1932).
- KRAMER, M. : Integration of mutagenicity studies into toxicity tests.
Agents and Actions 3, 118 (1973).
- KREYBIG, T.v. : Extremitätenmißbildungen im Tierexperiment.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 15, 1213 (1965).
- KREYBIG, T.v. : Experimentelle Pränataltoxikologie.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 17. Beiheft, 11-40, 111-189 (1968).

- LANDAUER, W. ; SALAM, N. ; SOPHER, D. : Herbicide 3-amino-1,2,4-triazol as teratogen.
Environ. Res. 4, 539-543 (1971).
- LeROY BJERKE, E. et al.: Rückstandsversuche betreffend Phenoxyherbizide in Milch und Rahm.
J. Agr. Food Chem. 20, 963-967 (1972).
- LEGATOR, M.S. ; PALMER, K.A. ; ADLER, I.-D. : A collaborative study of in vivo cytogenetic analysis.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 24, 337 (1973).
- LEVAN, A. ; HSU, T.C. ; STICH, H.F. : The idiogram of the mouse.
Hereditas 48, 677 (1962).
- LINDQUIST, N.G. ; ULLBERG, S. : Distribution of the herbicide 2,4,5-T in pregnant mice.
Experientia (Basel) 27, 1439-1441 (1971).
- LINSER, H. : The chemistry and mode of action of plant growth substances.
Proc. of a Symposium held at Wye Coll. (University of London). Ed. by WAIN, R.L. and WIGHTMAN, F., Butterworth Scientific Publications, London (1956).
- LORKE, D. : Embryotoxische Wirkungen an der Ratte.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. und Pharmacol. 250, 306-382 (1965).
- LORKE, D. : Untersuchungen von Cyclamat auf mutagene Wirkung im Dominant-Letal-Test an der Maus.
Humangenetik 18, 165-170 (1973).
- MACHEMER, L. ; STENGER, E.G. : Zur Reproduzierbarkeit der Resultate mit Cyclophosphamid und Triaziquon im Dominanten-Letal-Test an der Maus.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 21, 1037 (1971).
- MACHEMER, L. ; LORKE, D. : Dominant lethal test in the mouse for mutagenic effects of saccharine.
Humangenetik 19, 193-198 (1973).

- MACKENSEN, J.A. ; STEVENS, L.C. : Rib fusions - a new mutation in the mouse.
J. Hered. 51, 264-268 (1960).
- MANYAK, A. ; SCHLEIERMACHER, E. : Action of mitomycin C on mouse spermatogonia.
Mut. Res. 19, 99-108 (1973).
- MARQUARDT, H. : Neuere Auffassungen über einige Probleme aus der Pathologie der Kernteilung.
Naturwissensch. 37, 416-424, 433-438 (1950).
- MARTIN, H. : Die wissenschaftlichen Grundlagen des Pflanzenschutzes, S. 421, 445.
Verlag Chemie GmbH (1967).
- MARTIN, H. : Pesticide Manual.
Brit. Crop Protection Council (1968).
- MATTHIASCHK, G. : Über den Einfluß von L-Cystein auf die Teratogenese durch Thiram(TMTD) bei NMRI-Mäusen.
Arch. Toxikol. 30, 251-262 (1973).
- MEDVED, I.L. et al.: Embryotoxische Wirkung von Eptham.
Vrať delo Kiev 5, 140-143 (1970).
- MORELAND, D.E. ; HILL, K.L. : J. Agr. Food Chem. 7, 832 (1959).
- MÜLLER, H. : Ein Beitrag zum Einsatz des Wachstumsregulators Chlorcholinchlorid im Gemüsebau.
Qualitas Plant. Mater. Vegetabiles 22, 65-81 (1972).
- NEUBERT, D. ; DILLMANN, I. : Embryotoxic effect in mice treated with 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 272, 243-264 (1972).
- NIKOLS, W.W. : Cytogenetic techniques. International workshop on mutagenicity testing. Workshop Manual, Zürich (1972),

- NOMBELA, J.J.A. ; MURCIA, C.R. : Identification of mouse chromosomes by secondary constriction.
Chromosoma 37 , 63 (1973).
- NUTTER, E.C. ; CORNMANN, F.J. : Experiments in crabgrass control with potassium cyanate.
Proc. North. States Weed Contr. Conf. (1950).
- OBE, G. : Untersuchungen über die Wirkung einer alkylierenden Verbindung (Chinon I) auf menschliche Chromosomen in vitro.
Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1967).
- OBE, G. ; SPERLING, K. ; BELITZ, H.J. : Some aspects of chemical mutagenesis in man and drosophila.
Angew. Chem. Intern. Ed. 10, 302 (1971).
- OBE, G. : Intrachromosomal distribution of chemically induced achromatic lesions and isochromatic breaks in Vicia faba.
Mut. Res. 15, 224 - 226 (1972).
- OELKERS, F. : Weitere Versuche zur Mutagenitätsauslösung durch Chemikalien.
Biol. Zentralbl. 65, 176 - 186 (1946).
- OETTEL, H. ; FROHBERG, H. : Zusammenfassender Bericht über H-95-1 und seinen Wirkstoff N-p-Chlorphenyl-N-methyl-N-isobutinylnharnstoff.
BASF, Pharmakologisches Institut (1965).
- PARKIN, R. ; WAYNFORTH, H.B. ; MAGEE, P.N. : The activity of some nitroso compounds in the mouse dominant lethal mutation assay.
Mut. Res. 21, 155-161 (1973).
- PERKOW, W. : Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel.
Paul Parey-Verlag (1971).
- PHILIP, P. ; JENSEN, M.K. : Benzene induced chromosome abnormalities in rat bone marrow cells.
Acta pathol. microbiol. Scand. 78, 489 (1970).

- POHL, D. : Problematik der in vitro- und in vivo-Mutagenitätsprüfung.
Batelle-Information 9, 9-23 (1971).
- POLAND, A.P. ; SMITH, D. ; METTER, G. ; POSSICK, P. :
A health survey of workers in a 2,4-D and 2,4,5-T plant with special attention to chloracne, porphyria and physiologic parameters. *Archs. Envir.* 22, 316 (1971).
- PREACHE, M. ; GIBSON, J.E. : Enhancement of Dinoseb-induced teratogenesis by maternal food deprivation in mice.
Ref. In: *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 29, 122 (1974).
- RAY, V.A. ; HOLDEN, H.E. ; ELLIS, J.H. ; HYNECK, M.L. :
A study of triflupromazine in dominant lethal, cytogenetic and host mediated assay.
Mut. Res. 18, 301-309 (1973).
- RIEGER, R. ; MICHAELIS, A. : Chromosomenmutationen.
Gustav Fischer- Verlag, Jena. S. 51-132, 159, 271 (1967).
- RÖHRBORN, G. : Mutagenicity test in mice. I: The dominant lethal methode and the control problem.
Humangenetik 6, 345 (1968).
- RÖHRBORN, G. : The dominant lethal method and cytogenetic investigations of early cleavage stages.
In: VOGEL und RÖHRBORN: Chemical mutagenesis in mammals and man. S. 148-155. Springer-Verlag (1970).
- RÖHRBORN, G. : The activity of alkylating agents.
In: VOGEL und RÖHRBORN: Chemical mutagenesis in mammals and man. S. 294. Springer (1970).
- RÖHRBORN, G. : Possibilities of routine in vivo mutagenicity testing in mammals.
Arch. Toxicol. 28, 120 (1971).

- ROLL, R. ; BÄR, F. : Untersuchungen über die teratogene Wirkung von beta-Aminopropionitril bei trächtigen Mäuseweibchen.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 18, 806 (1968).
- ROLL, R. ; BÄR, F. : Untersuchungen über die teratogene Wirkung von Hydroxyharnstoff während der frühen und embryonalen Entwicklung der Maus.
Arch. Toxicol. 25, 150-168 (1969).
- ROLL, R. : Untersuchungen über die teratogene Wirkung von 2,4,5-T bei Mäusen.
Fd. Cosmet. Toxicol. 9, 671-676 (1971).
- ROLL, R. : Teratologische Untersuchungen mit TMTD (Thiram) an zwei Mäusestämmen.
Arch. Toxicol. 27, 173-186 (1971).
- SCHEIDT, W. ; TRAUT, H. : Ultraviolet-microscopical on achromatic lesions induced by X-rays in the chromosomes of Vicia faba.
Mut. Res. 10, 159 (1970).
- SCHEIDT, W. ; TRAUT, H. : Visualisation by scanning electron microscopy of achromatic lesions induced by X-rays in Vicia faba.
Mut. Res. 11, 253 (1973).
- SCHLEIERMACHER, E. : Chromosome aberrations in mitosis and meiosis in vivo.
Arch. Toxicol. 28, 105-114 (1971).
- SCHMID, W. : Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells.
Agents and Actions 3, 77-85 (1973).
- SCHMID, W. ; ARAKAKI, D.T. ; BRESLAU, N.A. ; CULBERTSON, C.: Chemical mutagenesis. The chinese hamster bone marrow as an in vivo test system.
Humangenetik 11, 103 (1971).
- SCHNEDL, W. : The karyotype of the mouse.
Chromosoma 35, 111-116 (1971).

- SCHROEDER, T.M. : Investigation of bone marrow smears. In:
VOGEL und RÖHRBORN: Chemical mutagenesis in
mammals and man. S. 214-219.
Springer-Verlag (1970).
- SCHWETZ, B.A. ; SPARSCHU, G.L. ; GEHRING, P.J. : The effect
of 2,4-D and esters of 2,4-D on rat embryonal,
fetal and neonatal growth and development.
Fd. Cosmet. Toxicol. 9, 801-817 (1971).
- SCHWETZ, B.A. ; GEHRING, P.J. : The effect of tetrachlor-
phenol and pentachlorophenol on rat embryonal
and fetal development.
Ref. in: Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 455
(1973).
- SEMPINSKA, E. : Radiation-induced chromatid aberrations in
the bone marrow and lymph nodes of the rat.
Mut. Res. 17, 121-126 (1973).
- SOUCI, S.W. ; MERGENTHALER, E. : Fremdstoffe in Lebens=
mitteln. München (1958).
- STAPLEY, J.H. ; GAYNER, F.C.H. : World Crop Protection,
Vol.1 : Pests and Diseases. London, Iliffe
Books Ltd. (1969).
- STEVENS, L.C. ; MACKENSEN, J.A. : The inheritance and ex=
pression of a mutation in the mouse affec=
ting blood formation, the axial skeleton and
body size.
J. Hered. 49, 153-160 (1958).
- STYLES, J.A. : Cytotoxic effects of various pesticides in
vivo and in vitro.
Ref. in: Mut. Res. 21, 50 (1973).
- STYLES, J.A. : Mutagenic effects of benzimidazol carba=
mate (BCM) and related pesticides.
Ref. in: Mut. Res. 21, 50 (1973).
- THEILER, K. ; STEVENS, L.C. : The development of rib fu=
sions, a mutation of the house mouse.
Amer. J. Anat. 106, 171-183 (1960).

- EMERSON, D.N. ; EMERSON, J.L. ; STREIBING, J. ; GERBIG, C. ;
ROBINSON, V.B. : Teratology and postnatal
studies on 4-amino- 3,5,6-trichloropicolinic
acid (Picloram) in the rat.
Fd. Cosmet. Toxicol. 10, 797-803 (1972).
- ULLMANN : siehe FOERST, W.
- VERRETT, M.J. : Statement before the Subcommittee of Energy,
Natural Resources and the Environmental of
the U.S. Senate Committee on Commerce. (1970).
- WAYGOOD, E.R. ; OAKS, A. ; MACLACHLAN, J.A. : Can. J. Bot.
34, 54 (1956).
Ref. in: C.A. 50, 5106a.
- WEGLER, R. ; EUE, L. : Chemie der Pflanzenschutz- und
Schädlingsbekämpfungsmittel. S. 165-395.
Springer-Verlag (1970).
- WITSCHI, H.P. : The biophysical pathology of rat lung
after acute Paraquat poisoning.
Ref. in : Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 457
(1973).
- WRIGHT, M.E. : Undulated - a new genetic factor in Mus
musculus affecting the spine and tail.
Heredity 1, 137-141 (1947).
- YASUDA, M. ; MAEDA, H. : Teratogenic effects of 4-chloro-
-2-methylphenoxyacetic acid ethylester (=
MCPEE) in rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 326-333 (1972).
- YODER, J. ; WATSON, M. ; BENSON, W.W. : Lymphocyte chromo=
some analysis of agricultural workers during
extensive occupational exposure to pesti=
cides.
Mut. Res. 21, 335-340 (1973).

Lebenslauf

Ich wurde am 3. August 1941 als Sohn des Beamten Johannes Matthiaschk und seiner Ehefrau in Berlin geboren.

Von 1947 bis 1952 besuchte ich die Sybel-Schule in Berlin-Charlottenburg, um danach auf die 1. OWZ Schiller-Schule eingeschult zu werden. Nach der Trennung der Klassen wechselte ich auf den Mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Natorp-Oberschule in Berlin-Friedenau über und bestand dort 1961 das Abitur.

Mit Beginn des Wintersemesters 1961/1962 wurde ich an der Freien Universität Berlin im Fach Humanmedizin immatrikuliert. Vom Sommersemester 1966 bis zum Wintersemester 1968/1969 war ich an der Universität Innsbruck in den Fächern Pharmazie und Biologie eingeschrieben. 1969 kehrte ich an die Freie Universität Berlin zurück, bestand im Oktober 1970 das Vordiplom und im Juni 1972 die Diplomprüfung.

Seit August 1971 bin ich Wissenschaftlicher Angestellter beim Bundesgesundheitsamt, Abt. Toxikologie. Hier fertigte ich sowohl die Diplomarbeit als auch die Dissertation an.

